

Б. Н. ТАРУСОВ, И. И. ИВАНОВ, Ю. М. ПЕТРУСЕВИЧ

СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

1967

Б. Н. ТАРУСОВ, И. И. ИВАНОВ, Ю. М. ПЕТРУСЕВИЧ

СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1967

УДК 612.014.445

Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета
Московского университета

2—10—2
39—66

ВВЕДЕНИЕ

Многие растительные и животные организмы обладают способностью светиться в видимой части спектра. Это явно приспособительное свойство, так называемая биолюминесценция, особенно большое развитие получило у глубоководных организмов морей и океанов — бактерий, простейших ракообразных, рыб, моллюсков, а также у наземных насекомых и совершенно не отмечалось у высокоорганизованных форм. Природа биолюминесценции обусловлена специализированной ферментативной реакцией окисления, при которой путем взаимодействия двух веществ люциферина и люциферазы происходит распад аденозинтрифосфата (АТФ), сопровождающийся высвечиванием. Характерной особенностью этой реакции является высокий коэффициент превращения энергии реакции в световую, который у некоторых организмов достигает почти 100%.

Однако уже давно высказывались предположения, что помимо этого специализированного излучения в биологических системах существует слабое излучение универсального типа, свойственное всем клеткам организмов и являющееся отражением происходящих в клетках энергетических процессов.

Еще в тридцатых — сороковых годах нашего столетия В. Лепешкин (Lepeschkin, 1933) сообщил о том, что им обнаружено очень слабое излучение в области ультрафиолета, которое он экспериментально обнаружил с помощью специальных фотопластинок с низким содержанием желатины (пластинки Шумана). Это излучение сопровождало процессы гибели клеток и возникало при коагуляции биоколлоидов и распаде липопротеиновых комплексов протоплазмы.

Подобные исследования развития не получили, хотя в литературе излучения, открытые Лепешкиным, долго фигурировали, как некробиотические лучи.

В тридцатых годах появились работы А. Г. Гурвича (1934), в которых он сообщал об обнаружении им универсального излучения в области коротковолнового ультрафиолета, испускаемого растительными и животными клетками. Это излучение улавливалось биологическими детекторами, в качестве

которых применялись культуры клеток дрожжей. По концепции Гурвича и его учеников, излучения представляли собой специфический фактор, активирующий клеточное деление; поэтому они получили название митогенетических.

Эти исследования вызвали большой интерес, так как возникли надежды получить с их помощью информацию о некоторых процессах, протекающих в живых клетках. В работах А. Г. Гурвича делались попытки использовать митогенетические излучения для диагностики раковых опухолей и осветить проблему биохимических превращений в межуточном обмене веществ в клетках. Однако единственным детектором, который позволял регистрировать эти излучения, служил биологический детектор. Были предприняты попытки уловить это излучение физическими методами, путем измерения окислительно-восстановительного потенциала, с помощью активирования фотохимических реакций и, наконец, непосредственно счетчиками Гейгера. В некоторых публикациях сообщалось о возможности обнаружения митогенетического излучения физическими объективными методами. Однако выводы этих работ не подтвердились, что привело к приостановке подобных исследований; биологический же метод оказался очень капризным и требовал большой математической обработки.

В последнее время подобные исследования вновь стали возобновляться. С. В. Конев (1965) сообщил, что ему с помощью фотоумножительной установки удалось уловить статистически достоверный эффект ультрафиолетового излучения от синхронной дрожжевой культуры, у которой в результате специальных условий культивирования клетки вступают в фазу деления почти одновременно.

В 1954 г., построив высокочувствительную установку в режиме счетчика фотонов и применив охлаждение фотокатода до —50° С, итальянские физики Л. Коли, Х. Фачини и А. Росси (Colli, Facchini, Rossi, 1964, 1965) поместили перед фотоумножителем большое количество корней проростков растений и обнаружили, что они испускают очень слабое излучение в видимой части спектра. Эти исследователи дали приближенно спектральную характеристику излучения и установили его постоянство. Наличие такого излучения в видимой части спектра было подтверждено в последнее время В. А. Веселовским, Е. Н. Секамовой и Б. Н. Тарусовым (1963); они сообщили, что это излучение испускается клетками корней самых различных растений.

В эти же годы появились сообщения о том, что с помощью фотоумножителей также можно обнаружить слабое излучение от зеленых частей растений после их предварительного облучения видимым спектром (Strehler, 1951; Владимиров, Литвин, 1959). Это индуцированное светом излучение суще-

ственно отличалось от вышеупомянутого тем, что оно было кратковременным и быстро затухало в темноте.

Применяя глубокое охлаждение фотоумножителя до —170° С для того, чтобы снизить уровень шумов, и используя квантометрический режим, регистрации, Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода и А. И. Журавлев (1961, 1962) установили, что органы животных с неповрежденной поверхности испускают очень слабое, как его назвали, сверхслабое излучение в видимой части спектра. Оно оказалось более слабым, чем излучение от растительных тканей. В опытах измерялось излучение с поверхности печени, мозга и других органов животных (мышей и крыс) при вскрытой брюшной полости и черепной коробке (рис. 1). Результаты измерений приведены в табл. 1.

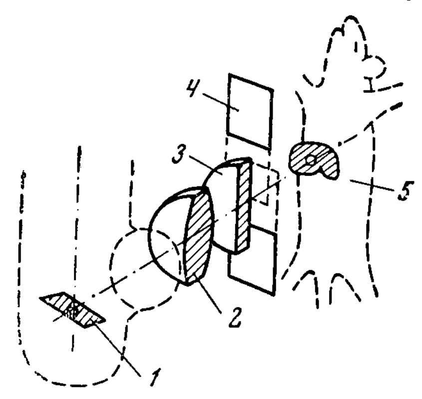


Рис. 1. Схема измерения слабых излучений:

1 — фотокатод; *2* — конденсор; *3* — светофильтр; *4* — затвор; *5* — печень животного

Эти исследователи нашли, что интенсивность излучения в значительной степени зависит от температуры и уменьшается при ее снижении (величина температурного коэффициента порядка 2—3). С гибелью животных после кратковременного усиления излучение снижалось. Было показано, что измельченные гомогенизированные ткани могут

Таблица 1

Прижизненное спонтанное свечение органов и тканей крыс с площади 1 $см^2$

Объект исследования	Температура, °С	Фон	Излучение, *имп/мин·см²*, продолжительность	
			10 *мин*	60 *мин*
Печень	38	23±0,7	54±1,1	54±0,7
Печень	26	26±0,7	27±1,9	28±0,7
Мышцы брюшной стенки	38	28±0,7	43±1,7	41±0,6
Головной мозг	38	26±0,7	47±0,5	47±0,9
Кишечник	38	28±0,7	39±0,4	41±0,3

еще излучать в течение нескольких часов. Было также установлено, что это излучение происходит только в присутствии кислорода.

В области слабых излучений, как известно, нужно учитывать возможность возникновения двух типов излучения. Первое — индуцированную люминесценцию, которая может возникнуть в структурных элементах биологических систем. Под влиянием внешних источников энергии в некоторых субстратах возникают длительные метастабильные возбужденные состояния, которые постепенно разряжаются и при этом отдают свою энергию в виде светового излучения. Это широко распространенный тип люминесценции, который возникает в различных веществах — полимерах, металлах, и, например, в таких природных веществах, как целлюлоза. Индуцированная люминесценция в растительных клетках чаще всего возникает за счет образования возбужденных состояний в целлюлозе и в пигментах. Основным признаком этой люминесценции служит постепенное ее падение по экспоненциальному закону, иногда в течение десятков минут. Интенсивность излучения такого типа не зависит от изменения температуры в пределах —10—150° С и от содержания кислорода.

Второй тип излучения сопровождает окислительные реакции. Интенсивность подобного излучения зависит от концентрации кислорода и температуры. Это так называемая хемилюминесценция.

На основании характеристики спонтанного сверхслабого излучения животных и растительных клеток можно твердо сказать, что это хемилюминесценция. Изучение спектрального состава сверхслабых излучений было приближенно осуществлено с помощью светофильтров. Применение монохроматоров и спектрометров исключалось из-за очень низкой интенсивности этого излучения. Для получения большей достоверности пришлось интенсифицировать его ионизирующими излучениями и повышением температуры до возможного предела.

Таблица 2

Интенсивность излучения (*имп/мин·см²*) при применении светофильтров. Фон 24±0,1 *имп/мин*.

Объект исследования	Общее излучение	Излучение в области пропускания фильтра		
		400—700 *ммк*	410—500 *ммк*	490—550 *ммк*
Печень (гомогенат) . .	43±0,8	41±0,6	32±0,9	37±1,2
Печень облученного животного	72±2,0	67±2,1	44±0,9	56±2,7

Эти данные показали, что значительная часть излучения лежит в сине-зеленой части спектра. Фотоумножитель ФЭУ-18, которым производились вышеуказанные измерения, имеет увиолевое окно с областью пропускания до 2800 Å, однако установить наличие какого-либо заметного излучения в области ультрафиолета не удалось. Оставалось неясным, нет ли излучения и в более длинноволновой части спектра. Позднейшие исследования (Попов, Тарусов, 1964) с фотоумножителем ФЭУ-22, чувствительным к этой области, показали, что в сверхслабом биологическом излучении животных и растительных тканей значительная его доля приходится на красную область спектра.

Подсчеты показывали, что общая интенсивность улавливаемого фотоумножителем излучения была не больше 1% от общего поверхностного излучения. Учитывая самопоглощение, которое для этого участка спектра достаточно велико, следует полагать, что общее выделение световой энергии в единице объема (*см*^{3}) будет порядка 10^{-12} *эрг/сек*. На растительных и животных тканях было установлено, что сверхслабое излучение сильно ослабляется, если снижать парциальное давление кислорода; подавляется при прибавлении к тканям антиоксидантов цистеина и цистеамина и др. Наряду с этим было показано, что интенсивность свечения не связана мало зависит от интенсивности дыхания. Эти данные отражают близость механизмов сверхслабого свечения в животных и растительных тканях, а также показывают, что излучение, по-видимому, связано с неферментативным процессом, не лежащем непосредственно в цикле обменных реакций.

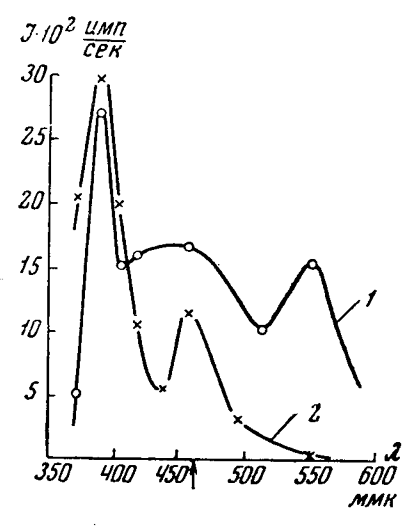


Рис. 2. Спектры хемилюминесценции олеиновой кислоты и гомогената печени крысы:

1 — олеиновая кислота; *2* — гомогенат печени; *I* — интенсивность хемилюминесценции, λ — длина волны излучения

Исследования с фракционированием животных гомогенатов на центрифуге показали, что, в основном, излучает верхняя, наиболее легкая фракция, содержащая липиды. Это дало основание высказать предположение, что источником излучения сверхслабых свечений является медленно протекающая реакция окисления липидных структур клеток.

Было установлено, что различные липиды, извлеченные из животных и растительных тканей, масла растительные и животные, олеиновая кислота при их самопроизвольном окислении на воздухе испускают сверхслабое излучение, по спектральному составу сходное с тем излучением, которое испускается живыми организмами (рис. 2).

При экстракции липидов из тканей спиртом, эфиром или бутанолом у лишенных липидов гомогенатов этих тканей свечение отсутствует.

Все это с самого начала исследования говорило о том, что сверхслабое излучение может служить источником информации об окислительных процессах, развивающихся в клеточных структурах. С этой точки зрения, изучение этого свечения представляется очень ценным, потому что с нарушениями липидных структур связано развитие различных патологических процессов.

I. МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ СВЕРХСЛАБОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Первые попытки измерить слабые излучения от биологических объектов делались с помощью фотографических пластинок. В сороковых годах нашего столетия были попытки применить для этой цели гиперсенсибилизированные выдержанные в парах аммиака фотографические пластинки, однако неудачно, так как сенсибилизация не давала стабильных результатов.

Позже, в связи с работами по биологическому обнаружению митогенетических лучей, были сделаны попытки применить для этой цели счетчики фотонов Гейгера. Первоначальные сообщения о том, что этими методами можно было зарегистрировать очень слабые ультрафиолетовые излучения от биологических объектов, не нашли подтверждения.

Реальная возможность измерения очень слабых источников люминесценции стала возможной только с появлением фотоумножителей (изобретенных у нас Л. А. Кубецким, 1930), которые в течение последнего времени достигли высокого совершенства (Чечик, Файнштейн, Лившиц, 1957). Усиление фототока, благодаря вторичной эмиссии, и наличие обычно не менее десяти каскадов усиления дают возможность достигнуть порога чувствительности до 10^{-13}—10^{-14} *лм*. Максимальная возможность фотоумножителя для измерения очень слабых световых потоков определяется, как известно, отношением сигнала к напряжению помех-шумов. Еще недавно у самых совершенных фотоумножителей это отношение было таким, что измерить какие-либо световые потоки от биологических систем не представлялось возможным.

Единственный реальный путь повышения чувствительности фотоумножителей это возможно большее охлаждение фотокатода. При таком охлаждении, уровень шумов сильно снижается, чувствительность же фотокатода падает незначительно. Например, для фотоумножителей с сурмяно-цезиевым фотокатодом понижение температуры с 20° С до —196° С снижает уровень шумов на три порядка, чувствительность же

фотокатода падает не больше, чем на порядок, поэтому такое охлаждение может значительно поднять разрешающую способность. Этот принцип был использован впервые Л. Коли, В. Фачини и А. Росси (1954). Они применили торцовый фотоумножитель с большим фотокатодом, нанесенным на стекло баллона, и поместили его в камеру, наполненную циркулирующей охлаждающей смесью ацетон — сухой лед. Более сильного охлаждения указанные авторы не могли применить в связи с тем, что при понижении температуры ниже —50, 60° С обычно происходит отслаивание фотокатода от стекла и его разрушение. Однако этого охлаждения оказалось достаточным для того, чтобы зарегистрировать с поверхности 100 $см^2$ четкие сигналы излучения от корней проростков растений. Источник излучения находился близко, на расстоянии 1—2 *см* от фотокатода, и поэтому светосбор был достаточно эффективным. Слой прозрачной жидкости между объектом и фотокатодом играл роль световвода.

При регистрации более слабого излучения животных тканей (Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода, А. И. Журавлев) был использован фотоумножитель ФЭУ-18 с внутренним сурьмяно-цезиевым фотокатодом и увиолевым окном, поэтому его спектральный диапазон распространялся от 6500 до 2000 Å. Этот фотоумножитель можно охлаждать до —180° С жидким азотом, при этом шумы снижались на четыре-пять порядков. Однако недостаток такого фотоумножителя состоит в том, что между фотокатодом и объектом довольно большое расстояние (до 7 *см*), а это заставило исследователей прибегнуть к концентрированию излучения на фотокатоде с помощью линз, что давало некоторое, правда незначительное, усиление сигнала.

Неудобство подобной системы состоит в том, что при охлаждении необходимо было удерживать большой градиент постоянной температуры между объектом ($t=38°$ С) и фотоумножителем ($t=-180°$ С). Тем не менее с помощью этого прибора удалось четко зарегистрировать излучение от поверхности печени, мозга и других органов. Кроме того практически невозможно точно поддерживать в течение длительного времени температуру фотоумножителя, и в силу этого его чувствительность варьировала.

Венгерские физики для уменьшения шумов предложили отклонять шумовые электроны внешним магнитным полем соленоида. Благодаря этому происходило уменьшение площади фотокатода и, варьируя интенсивностью поля, его можно было в различной степени диафрагмировать применительно к оптимальным условиям. На небольшую работающую часть катода оптической системой производится концентрация излучения. Для повышения чувствительности были выпущены фотоумножители (зарубежными фирмами), у которых фотока-

тод уменьшен, в результате чего уменьшены темновые шумы фотоумножителя.

В последнее время в продаже появился разработанный специально для измерения сверхслабых свечений фотоумножитель ФЭУ-42, который решает проблему на современном уровне. Он обладает очень низким уровнем шумов, благодаря отклонению шумовых электронов специальными электростатическими линзами, создаваемыми с помощью фокусирующих электродов. При применении фотоумножителей для измерения сверхслабых излучений следует учитывать, что максимальную чувствительность можно получить при индивидуальном подходе к каждому фотоумножителю, подбирая экспериментально напряжение (особенно на фокусирующих электродах). Следует также иметь в виду, что фотокатод, находящийся под напряжением, нужно тщательно предохранять от дневного рассеянного света, так как даже очень кратковременное засвечивание его резко снижает чувствительность фотокатода на длительные периоды времени, а иногда и необратимо.

При конструировании камеры необходимо избегать применения материалов, которые могут люминесцировать или излучать в результате окисления, например, металлические окисляющиеся поверхности, или кварц, стекло, плексиглас, целлюлоза, в которых даже при засвечивании слабым, рассеянным светом вследствие образования метастабильных состояний возникает вторичная люминесценция в видимой части спектра. Эта вторичная люминесценция может продолжаться, спадая по интенсивности, в течение нескольких десятков минут (табл. 3). Это фактор, с которым приходится серьезно считаться при измерении сверхслабых биологических свечений.

Для исключения подобного свечения необходимо подбирать соответствующие материалы, кроме того конструкция камеры должна быть такова, чтобы абсолютно не допускать засвечивания ни фотоумножителя, ни объекта.

Таблица 3

Послесвечение некоторых материалов после засвечивания дневным светом в течение 5 минут

Объект исследования	Излучение *имп/мин·см²* после засвечивания через		
	1 *мин*	10 *мин*	40 *мин*
Фон	30±3	30±3	30±3
Фильтровальная бумага беззольная	234±2	137±19	48±9
Плексиглас	181±27	87±11	32±6
Кварц	240±33	—	34±6
Шерсть крысы	220±21	103±151	52±4
Эбонит	30±5	—	—

Возможность измерения сверхслабых излучений биологических объектов зависит помимо фотоумножителя от выбора общей схемы. Фотоумножитель преобразовывает световой сигнал в электрический, при этом количество электронов в нем возрастает и превращается на выходе умножителя в электрические импульсы. Число этих импульсов пропорционально числу квантов, падающих на фотокатод. Далее полученные импульсы должны быть усилены и зарегистрированы.

Обычно при измерениях сверхслабых излучений приходится иметь дело со световыми потоками от 10^2 до 10^6 *квант/сек* на *см*^{2} излучающей поверхности ($10^{-14} \div 10^{-10}$ *лм*). На выходе фотоумножителя это приводит к появлению от 10 до 10^{+5} *имп/сек* длительностью порядка микросекунды. Для уси-

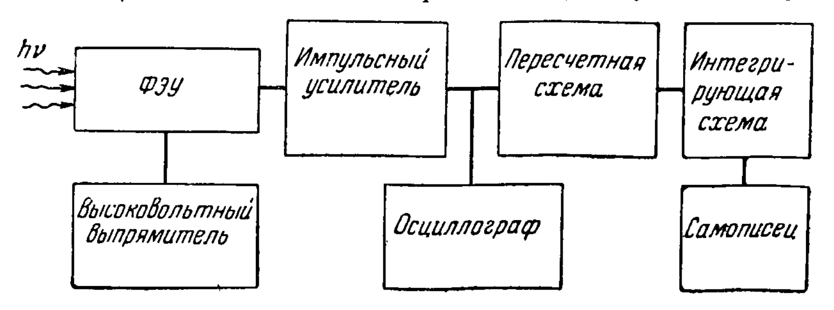


Рис. 3. Блок-схема счетчика квантов

ления этих импульсов применяются специальные импульсные широкополосные усилители (УШ-2, УШ-10, усилитель установки ДБ и некоторые другие, применяемые в дозиметрических устройствах). Основные требования, которым они должны удовлетворять, следующие: 1 — равномерное усиление в диапазоне частот от 10^3 до 10^6 *герц;* 2 — низкий уровень шумов входного каскада усилителя (меньше 10 *мкв*); 3 — достаточно высокий коэффициент усиления (10^4 — 10^5).

Импульсы, усиленные до нескольких вольт, передаются на пересчетные устройства, в которых они, проходя через ряд последовательно включенных электронных реле (триггеров), группируются определенным образом. Обычно применяется пересчет кратный 10 с использованием для регистрации специальных декатронных ламп. На этом принципе работают пересчетные устройства установки БЗ и «Волна», позволяющие регистрировать поступление импульсов со скоростью до 10^5 *имп/сек*. В установке «Волна», кроме того, имеется электронный секундомер, дающий возможность останавливать счетную схему через фиксированное время после начала поступления импульсов. Такая схема в целом носит название счетчика квантов (рис. 3). Подобные установки имеют обычно интегратор числа импульсов со стрелочным прибором.

Весьма удобным является интегратор скорости счета типа ИСС-3; он имеет достаточно широкий диапазон счета (от 5 до $5 \cdot 10^5$ *имп/сек*) и возможность изменять время интегрирования в 10—100 раз. Это создает дополнительное удобство при измерении очень слабых хемилюминесцентных излучений с интенсивностью несколько десятков или сотен квантов в секунду, когда существенно сказываются квантовые флуктуации света, а для измерения средних по времени значений нужно иметь возможность менять время интегрирования. В некоторых установках для измерения слабой хемилюминесценции применяют на выходе автоматический самопишущий прибор типа ЭПП-09 или аналогичный ему.

Опыт показывает, что успех в измерении сверхслабых биологических излучений в первую очередь зависит от удачного выбора фотоумножителя, который должен иметь следующие основные показатели: 1 — минимальный шумовой ток, не превышающий 50—100 *имп/сек*; 2 — максимальную интегральную чувствительность фотокатода; 3 — возможно большую площадь фотокатода; 4 — достаточную стабильность коэффициента усиления ФЭУ.

Первое требование удается выполнить только путем специальной конструкции входной системы фотоумножителей. Система глубокого охлаждения, хотя и давала значительное снижение шума и применялась в ранних опытах, в настоящее время используется сравнительно редко и для фотоумножителей с большими фотокатодами, нанесенными на стеклянную подложку, невозможна.

Наличие большого фотокатода позволяет сильно увеличить светосбор от объекта, а для фотоумножителей, хорошо работающих без понижения температуры, как, например, ФЭУ-42, также очень близко помещать объект от фотокатода.

Наличие на внешнем баллоне поясков для электростатической фокусировки, на которые накладывается потенциал, позволяет, варьируя этот потенциал, сортировать по энергиям электроны и этим изменять спектральную характеристику фотоумножителя.

Большое значение имеет подбор режима питания для фотоумножителя. Так, например, для фотоумножителя ФЭУ-42 при повышении общего напряжения от 600 до 1000 *в* сигнал и шум возрастает. Дальнейшее увеличение напряжения приводит только к росту сигнала, а шум увеличивается сравнительно мало. Область оптимального напряжения обычно лежит в интервале 1200—1400 *в*. Еще большее увеличение напряжения снова приводит к увеличению шумов, а это уменьшает отношение сигнал — шум. Кроме того, изменение питающего напряжения приводит к изменению спектральной характеристики фотоумножителя (рис. 4).

При исследовании спектров хемилюминесценции обычно применяются монохроматоры с диспергирующей призмой или диффракционной решеткой, позволяющие выделить определенный участок спектра, чтобы в дальнейшем его фотометрировать. При этом возможность выделения более узкого или более широкого участка спектра определяется коллимирующей щелью, возможностями фотометрирующей аппаратуры и интенсивностью общего пучка. В случае сверхслабых биологических излучений с интенсивностью всего лишь нескольких сотен или тысяч квантов в секунду применение подобных методов невозможно. Здесь нельзя ослаблять поток излучения более чем в 10—20 раз.

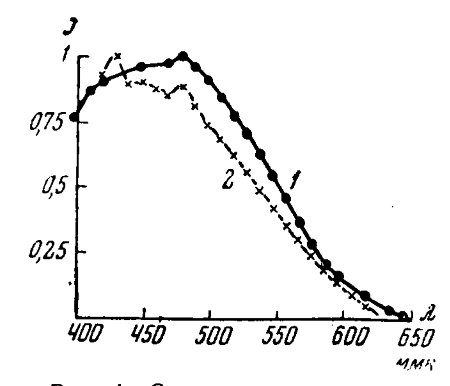


Рис. 4. Спектральные характеристики ФЭУ-42 при различных напряжениях:

1 — $V = 1200$ *в*; *2* — $V = 1300$ *в*; *I* — относительная спектральная чувствительность; λ — длина волны излучения

Единственно возможный метод учета спектрального состава — это применение светофильтров с резкими границами пропускания и широкой полосой. Для этой цели раньше применялись обычные светофильтры; лучшие результаты дают интерференционные фильтры, представляющие собой два слоя стекла или кварца со слоем диэлектрика между ними, имеющим толщину в четверть длины волны, пропускаемой фильтром с минимальным ослаблением. Характеристики этих фильтров имеют вид резонансных кривых с полушириной пропускания 8—15 *ммк* и коэффициентом пропускания от 30 до 50% (рис. 5). Относительно большая полоса их пропускания не мешает проведению спектральных измерений сверхслабой хемилюминесценции, где излучение является широкополосным.

В качестве модели сначала применялась окисляющаяся олеиновая кислота, однако в связи с тем, что процесс в ней протекал нестационарно, эта модель не давала должной стабильности, хотя, в ряде случаев, давала хорошую информацию. Очень стабильной и надежной оказалась модель электрохимического окисления. При электрохимическом окислении скорость процесса определяется величиной тока. Поддерживая постоянный электрический режим, можно вести реакцию с постоянной скоростью и на любом заданном уровне, что делает электрохимический метод особенно удобным для работ по окислению органических веществ и изучению фак-

торов, влияющих на это окисление. Электрохимическое окисление органических веществ сопровождается хемилюминесценцией, которая также, естественно, может поддерживаться на постоянном уровне и с различной заданной интенсивностью.

Особенно удобными веществами для получения свечения и стабильной концентрации окислительных радикалов служат циклические аминокислоты: тирозин, гистидин, фенилаланин

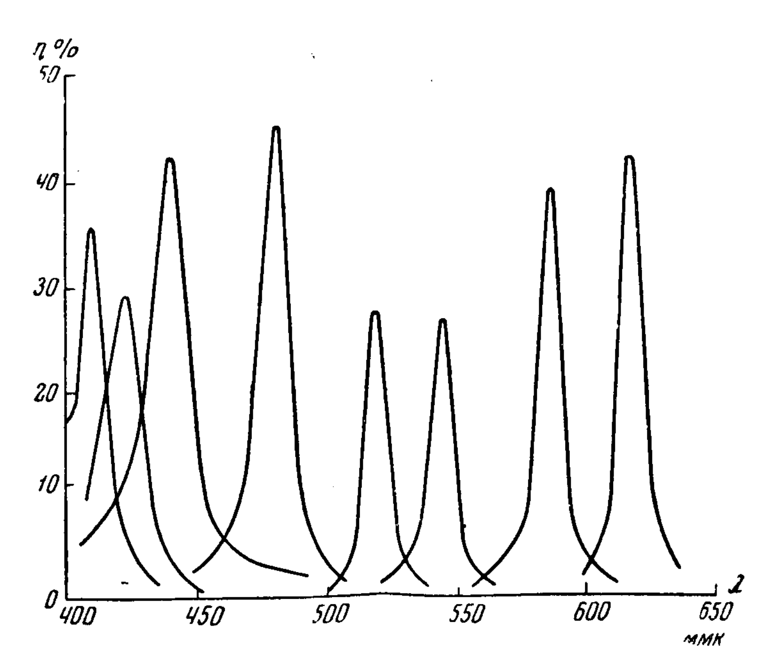


Рис. 5. Спектральные характеристики интерференционных светофильтров:
η — коэффициент пропускания, λ — длина волны излучения

и триптофан. Интенсивность свечения этих аминокислот в солевом растворе в электрохимической ячейке пропорциональна силе проходящего тока. При исследовании спектров их хемилюминесценции было установлено, что они дают максимум излучения в сине-зеленой части спектра. Последнее говорит о том, что в данном случае в акте рекомбинации выделяется 60—70 *ккал/моль*. Такая энергия может выделяться в случае взаимодействия радикалов. Схему окисления циклических аминокислот можно представить следующим образом. Если обозначить через R алкильный радикал соответствующей аминокислоты, а через RCOO — кислотный радикал, то можно схематически изобразить процесс анодного окисления

в следующем виде:

$$RCOOH \rightarrow RCOO: \xrightarrow{-e} RCOO^{\cdot}$$

$$RCOO^{\cdot} \rightarrow R^{\cdot} + CO_2$$

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow RR + h\nu$$

Первое уравнение показывает процесс на аноде, когда анион кислоты окисляется до кислотного радикала; второе уравнение — процесс образования активного радикала $R^{\cdot}$, а третье — процесс рекомбинации двух радикалов, в результате которого излучается квант света.

Однако, как показывают опыты со световой экранировкой электрода, хемилюминесценция возникает не только непосредственно около анода, но и на некотором расстоянии от него. Так как растворы аминокислот обладают очень низкой электропроводностью, для повышения скорости реакции (увеличения электропроводности) к раствору аминокислот добавляется электролитный раствор. Обычно применяется Na_2SO_4, который при электролизе образует кроме катиона и аниона еще кислород в результате распада SO_4 на SO_3 и $O^{\cdot}$. Этот кислород частично остается в молекулярном состоянии O_2, либо образует кислотный радикал по следующей схеме:

$$RCOOH + O^{\cdot} \rightarrow RCOO^{\cdot} + OH$$

$$RCOO^{\cdot} + RCOO^{\cdot} \rightarrow (RCO)_2 + h\nu + O_2$$

Интенсивность хемилюминесценции $I = fw$, где w — скорость окислительной реакции, а f — вероятность испускания фотона (выход свечения). Но поскольку изучение возникает при парной рекомбинации радикалов R, интенсивность свечения должна быть пропорцинальна квадрату концентрации этих радикалов: $I = f{\cdot}k[R]^2$. Экспериментально промеренная кривая зависимости интенсивности хемилюминесценции от квадрата концентрации тирозина дала линейную зависимость (рис. 6).

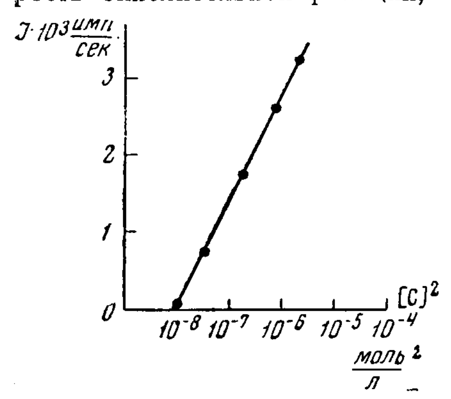


Рис. 6. Зависимость хемилюминесценции тирозина от квадрата его концентрации при электролитическом окислении:

I — интенсивность хемилюминесценции, $[C]$ — концентрация вещества

Увеличение концентрации соли Na_2SO_4 приводит при постоянном значении тока через электролитическую ячейку к возрастанию хеми-

люминесценции. Очевидно возрастание интенсивности хемилюминесценции характеризует нарастание скорости образования и рекомбинации возникающих радикалов. Повышение температуры приводит к уменьшению интенсивности хемилюминесценции водных растворов циклических аминокислот, подвергшихся электролитическому окислению. Для тирозина эта зависимость представлена на рис. 7. Исследование спектра свечения тирозина (Петрусевич, Иванов, 1965) показало, что он имеет два максимума в синей и желто-зеленой части спектра (рис. 8).

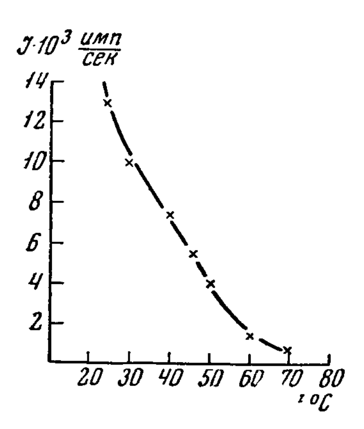


Рис. 7. Зависимость хемилюминесценции тирозина $5 \cdot 10^{-3}$ *моль/л* от температуры при его электролитическом окислении:

I — интенсивность хемилюминесценции; *t* — температура

Рис. 8. Спектр хемилюминесценции тирозина (10^{-3} *моль/л*) при его электрохимическом окислении:

I — относительная интенсивность излучения; λ — длина волны излучения

Интенсивность хемилюминесценции водных растворов циклических аминокислот существенно зависит от pH среды. С увеличением щелочности среды интенсивность хемилюминесценции возрастает, поскольку возрастает степень диссоциации аминокислот на анионы типа $R(NH_2)COO^-$, которые, отдавая электрон на аноде, образуют соответствующий кислотный радикал. В кислой среде преобладает диссоциация с образованием катионов $R(NH_3^+)COOH$, и выход радикалов соответственно уменьшается.

В подобной электрохимической ячейке производилось изу-

чение тушащего действия изолированных клеток, экстрактов из тканей, плазмы крови и т. д.

Количественно оценивалось ослабление интенсивности слабого свечения, которое генерировалось в электрохимической ячейке. Излучение в такой ячейке приводилось к возможно минимальному значению, так как чем меньше было излучение, тем чувствительнее метод определения тушения. В ряде кинетических работ (Васильев, Вичутинский, 1962, 1963) сообщалось, что люминесценция в реакциях жидкофазного окисления некоторых органических веществ подчиняется закону линейной зависимости между интенсивностью хемилюминесценции и скоростью окислительной реакции, которая в свою очередь пропорциональна квадрату концентрации радикалов окисляемого вещества. Было также показано, что хемилюминесценция подавляется веществами, входящими в группу ингибиторов свободно радикальных процессов. Аналогичный эффект оказывают биологические ингибиторы: некоторые витамины, вещества, защищающие от радиационного поражения и т. д.

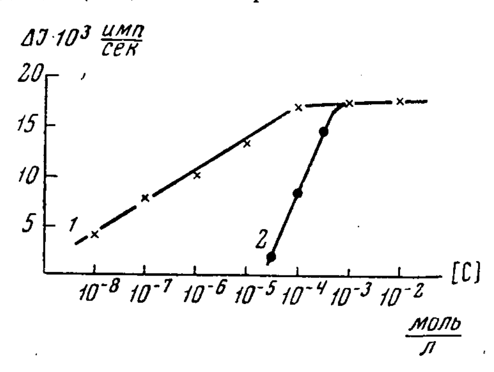


Рис. 9. Зависимость хемилюминесценции тирозина ($5 \cdot 10^{-3}$ *моль/л*) от концентрации ингибиторов при его электролитическом окислении:

1 — аскорбиновая кислота; *2* — АЭТ — α — аминоизотиуроний; ΔI — изменение интенсивности хемилюминесценции; $[C]$ — концентрация вещества

Если к среде, где происходит окислительная реакция с образованием первоначальной концентрации радикалов $[R]$ со скоростью w_0, добавить ингибитор в концентрации $[In]$, то установится новая скорость реакции, и следовательно, интенсивность хемилюминесценции $I = I_0 - \Delta I$. Из теории автокаталитических реакций (Эмануэль, Кнорре, 1962) можно показать, что при концентрации ингибитора меньшей, нежели концентрация окислительного радикала $[R]$, имеется линейная зависимость между изменением интенсивности хемилюминесценции ΔI и концентрацией ингибитора $[In]$ при постоянной концентрации радикалов $[R]$. Последнее условие выполняется в системах электролитического окисления циклических аминокислот, в случае ингибирования хемилюминесценции тирозина аскорбиновой кислотой, альфа-амино изотиоуронием (АЭТ) и т. д. (рис. 9).

II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СВЕРХСЛАБОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Еще недавно хемилюминесценция считалась редким явлением, сопровождающим развитие некоторых химических реакций. Было известно, что некоторые немногочисленные реакции окисления сопровождаются довольно интенсивным свечением (окисление фосфора, окисление соединений кремния, реагентов Гриньяра). В основном область этих излучений лежит в сине-зеленой части спектра, иногда, например при окислении соединений кремния,— в красной, реже обнаружены были линии в области ультрафиолета 2300—3500 Å (окисление фосфора).

В настоящее время в связи с усовершенствованием техники регистрации слабых световых потоков и с применением совершенных фотоумножителей удалось обнаружить значительно большее количество реакций, которые сопровождаются хемилюминесценцией.

Как было установлено в последнее время, хемилюминесценция, правда очень слабая, сопровождает реакции окисления углеводородов, различных органических веществ и полимеров, по интенсивности она приближается к хемилюминесценции биологических объектов (Васильев, Вичутинский, 1962, 1964). Выход люминесценции, как правило, очень низок по отношению к количеству реагирующих молекул, например 10^{-8}, при наиболее сильном свечении окисления фосфора и циклогидразидов и $10^{-10}—10^{-15}$, при окислении углеводородов, липидов, электрохимическом окислении аминокислот и др. Это гораздо меньше того, что наблюдается при биолюминесценции в специализированных органах различных светляков, ракообразных, рыб, где почти каждый акт распада молекулы АТФ дает выход фотона.

Биологическая сверхслабая хемилюминесценция по своему химическому механизму не относится к тому типу реакций, которые характерны для биолюминесценции, а явно имеет тот же характер, как и при обычных химических реакциях.

Еще в тридцатых годах французский исследователь Одюбер (Audubert, 1939) пытался обнаружить сверхслабую хемилюминесценцию при некоторых окислительных реакциях (окисления органических веществ перекисью марганца, дегидратации хинонсульфата при анодном окислении алюминия и др.), и особенно при реакции термического распада азидов. Измерения этой хемилюминесценции проводились вышеупомянутым автором с помощью счетчиков Гейгера, которые позволяли регистрировать очень слабые потоки ультрафиолетовых лучей, но обладали низкой чувствительностью в области видимого спектра. Поэтому вполне вероятно, что

нельзя считать обнаруженное им ультрафиолетовое излучение характерным для этих реакций, скорее всего ультрафиолетовое излучение было частью широкого спектра излучения, расположенного в основном в видимой части спектра.

Эффект высвечивания возникает при химических взаимодействиях вследствие того, что некоторая часть возбужденных реакционно способных молекул, в которых электроны перешли на высокие энергетические уровни, переходят на более низкие уровни или возвращаются в исходное состояние и отдают в виде квантов света полученную при возбуждении энергию, не использовав ее для построения химических связей. Такой процесс, естественно, наиболее вероятен при различных экзотермических реакциях, при которых происходит мобилизация химической энергии в реакциях радикального типа. Это в основном (а весьма возможно, что и преимущественно) различные реакции, при которых происходит окисление молекулярным кислородом или перекисью водорода и другими сильными окислителями. Значительное количество хемилюминесцирующих реакций обнаружено сейчас при окислении различных органических веществ, особенно при развитии и зарождении реакций, протекающих по цепному механизму. Особый интерес для понимания механизмов хемилюминесценции в биологических системах представляют реакции окисления в углеводородах жиров и той хемилюминесценции, которая возникает при окислении семихинонов молекулярным кислородом.

Некоторыми авторами высказывается предположение, что непосредственным актом, при котором возникает излучение, служит излучательный переход триплет-синглет. В связи с тем, что молекула кислорода находится в триплетном состоянии, раньше предполагали что переход из ее собственного триплетного состояния, в котором она находится в длительном возбужденном состоянии, в синглетное кратковременное, из которого электрон возвращается на свою орбиту, и дает излучение. Однако против этой схемы были выдвинуты возражения. Непосредственным актом излучения сейчас обычно считают акт рекомбинаций. В этом акте вероятность излучательного перехода очень незначительна и в большинстве случаев происходит тушение люминесценции.

Механизм хемилюминесценции в углеводородах с очень слабой интенсивностью был изучен в последние годы детально группой исследователей в институте химической физики АН СССР (Васильев, Карпухин, Шляпентех, 1961). Исходя из измерений длительности возбужденного состояния по хемилюминесценции и сопоставляя эти значения с характеристиками продуктов рекомбинации перекисных радикалов, был сделан вывод, что акт высвечивания встречается тогда, когда

происходит образование продуктов реакции — кетонов в триплетном возбужденном состоянии и переход их из этого состояния в синглетное состояние, которое и излучает (Васильев, 1962, 1963).

По схеме вышеуказанного автора процесс превращения химической энергии в люминесценцию слагается из следующих этапов:

1) безизлучательный переход — $RO_2+RO_2 \rightarrow O_2+$спирт$+$ $+$кетон; 2) рекомбинация перекисных радикалов; 3) излучательный переход — $RO_2+RO_2 \rightarrow O_2+$спирт$+P^*$.

Тот же процесс с образованием кетона в возбужденном состоянии. Этот возбужденный кетон и высвечивает $P^* \rightarrow P+h\nu$. Непосредственно выход люминесценции при переходе триплет-синглет уменьшается вследствие того, что происходит дезактивация многих молекул тушителями, перехватывающими электрон.

Эта схема безусловно представляет интерес, и есть полное основание предполагать, что по подобной схеме происходит и высвечивание в биологических субстратах, так как и в процессе окисления биолипидов также образуются кетоны. Именно на стадии их образования наблюдается один из пиков хемилюминесценции. Однако здесь, по-видимому, могут участвовать и другие звенья, так как этой схемой трудно объяснить высвечивание в начальных этапах развития реакции. Так, например, при длительном протекании реакции окисления олеиновой кислоты на воздухе в условиях невысоких температур во времени наблюдаются два резко отграниченные максимума. Первый максимум в течение первых 5—20 часов и второй — через 40—50 часов. Есть основания полагать, что высвечивание кетонов может происходить во время второго максимума, где кетоны можно обнаружить химически. В первом максимуме наблюдается наибольшее накапливание перекисных радикалов.

В последнее время появились сообщения, что сверхслабая хемилюминесценция обнаруживается и при некоторых неокислительных реакциях, например реакциях термического распада (Васильев, 1962). Однако хемилюминесценция, которая наблюдается в отсутствии кислорода, очень слаба и лежит на грани чувствительности приборов. При подведении кислорода такая неокислительная хемилюминесценция сильно возрастает. Это явление объясняют тем, что в подобного типа реакциях могут участвовать неокислительные радикалы R, которые при рекомбинации достаточно энергии не дают, чтобы высветить фотон видимого света. Однако этот радикал в присутствии кислорода переходит в перекисный радикал.

В большинстве реакций энергия излучения не выходит за

пределы испускания квантов с тепловыми энергиями, так как энергии возбуждения не хватает для испускания квантов света. Более оптимальные условия для хемилюминесценции имеются в тех химических реакциях, которые являются экзотермичными, когда освобождающаяся энергия достигает значений 50—70 *ккал/моль* и более; излучение в этих условиях возможно как в видимой, так и в ультрафиолетовой области. Такими реакциями, в которых образуются высокоэнергетические промежуточные продукты за счет мобилизации внутренних химических ресурсов, являются цепные реакции. В цепных реакциях окисления в углеводородах и жирах активным фактором служат перекисные радикалы. Энергии рекомбинации этих радикалов достаточно для того, чтобы производить испускание даже коротковолновых излучений. Спектр излучения хемилюминесценции будет определяться количеством энергии испускаемых квантов.

Надо иметь в виду, что энергия возбуждения может быть усилена или ослаблена присутствием веществ, способных перехватывать кванты энергии. Различают тушители, которые могут перехватывать электроны и снимать излучение, например, переводя синглетное состояние в длительное триплетное. Но возможен и перенос энергии на вещества, способные люминесцировать с более высоких уровней. В этом случае ряд молекул, у которых происходит безызлучательный переход, высветят свою энергию через молекулы активатора:

$$P^* + A_к \rightarrow A_к^* + P; \quad A_к^* \rightarrow A_к + h\nu.$$

Поэтому прибавление некоторых веществ с мало устойчивыми электронными состояниями может повысить интенсивность высвечивания при химических реакциях, а иногда превратить реакции неизлучающие в излучающие.

Подобную активацию хемилюминесценции могут осуществлять вещества, ингибирующие окисление, так как именно эти соединения должны вступать во взаимодействие и инактивировать активные радикалы, задерживая скорость реакции. Перехватывая энергию возбужденного состояния и высвечивания ее, они ингибируют реакцию.

В последнее время было установлено (Журавлев, 1962), что прибавление различных антиоксидантов к окисляющемуся липиду — олеиновой кислоте вызывает в итоге торможение реакции окисления. Однако в первый момент хемилюминесценция резко усиливается (Журавлев, 1962), хотя скорость реакции не меняется. Оказалось, что наибольшая интенсивность высвечивания наблюдается тогда, когда антиоксиданты добавляются при максимальном количестве перекисных радикалов (рис. 10).

Если прибавить к олеиновой кислоте хлорофилл, то он, как и другие ингибиторы, задерживает скорость реакции окисления; однако вспышка люминесценции происходит не в сине-зеленой части спектра, которая свойственна хемилюминесценции олеиновой кислоты, а в красном участке, характерном для спектра хлорофилла.

Исследователи, изучавшие хемилюминесценцию, пришли к чрезвычайно важному выводу: несмотря на то, что высвечивает очень незначительная часть молекул, это свечение отражает кинетику данной реакции. А отсюда измерения интенсивности хемилюминесценции позволяют определить ее основные кинетические параметры. Поэтому метод хемилюминесценции чрезвычайно ценен, так как позволяет проследить ход некоторых реакций в клетках, которые недоступны для изучения другими методами.

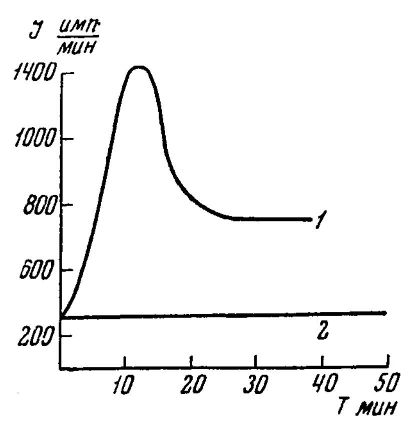


Рис. 10. Хемилюминесценция олеиновой кислоты при прибавлении цистеина — *1*; *I* — интенсивность хемилюминесценции; *T* — время с начала опыта; *2* — фон.

III. СУБСТРАТЫ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ В КЛЕТКАХ

Проведенные исследования позволили высказать предположение, что сверхслабая хемилюминесценция как-то связана с липидными веществами клеток, так как при центрифугировании гомогенатов сверхслабое свечение в основном наблюдалось в легкой фракции, содержавшей липиды. В пользу подобной точки зрения говорят и другие соображения. Различные сопоставления и применение веществ, токсически действующих на различные ферменты, говорят о том, что ферментативные окислительные процессы не связаны с возникновением сверхслабого свечения в видимой части спектра. Среди возможных генераторов этого излучения приходится искать реакции, в которых могут возникнуть радикалы с высокой активностью, характерной для экзотермических реакций.

В последние годы в связи с широко развернувшимся изучением механизмов действия различных токсических — физических и химических — агентов на организмы проводились сравнительные исследования химической реакционной спо-

собности веществ, входящих в состав организмов, особенно по отношению к окислению. Было установлено, что в условиях организма различные белки и нуклеиновые кислоты химически очень устойчивы. Реакционно же способными по отношению к окислению являются углеводы и, в большей степени, липиды. Это вполне согласуется с химическими представлениями о природе этих веществ.

В жирах в присутствии кислорода обычно возникают самопроизвольные реакции окисления. Эти реакции, как правило, протекают по цепному механизму с автоускорением. По терминологии химической кинетики, это цепная реакция с разветвленными цепями, где фактором разветвления служат гидроперекиси. Такие реакции подобны по механизму цепным взрывным реакциям, однако в жидкой фазе они развиваются медленно. Специфическая особенность этого типа реакций состоит в том, что скорость этих реакций сильно зависит от температуры и определяется соотношением развивающихся цепей к так называемым обрывающимся.

В процессе возникновения активных центров (не все из них развиваются в цепи и не все дают одинаково длинные цепи) часть из них погибает, растрачивая свою энергию в тепло. Эти обрывы цепей происходят при взаимодействии активных центров с молекулами примесей, и часто оказывается достаточным очень небольшого количества этих примесей для того, чтобы существенно ингибировать реакцию. Обрывы происходят и на границе разделов фаз, поэтому важное значение имеют объемы, в которых происходят реакции, при этом большую роль играет концентрация реагирующих веществ и конечных продуктов реакций. Эти особенности кинетики приводят к возникновению критических порогов и аномальных зависимостей. Например, скорость реакций окисления не пропорциональна концентрации кислорода. Ниже определенной концентрации кислорода настолько возрастает вероятность обрыва цепей, что реакция приостанавливается; с другой стороны при достаточно высоких концентрациях кислорода скорость реакции «парадоксально» снижается.

Общая схема подобного типа реакций, по Н. Н. Семенову (1958), применительно к углеводородам и липидам будет слагаться из процессов:

развитие цепи

$$1)\ R^{\cdot} + O_2 \rightarrow RO^{\cdot}_2, \quad 2)\ RO^{\cdot}_2 + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot},$$

обрыв цепей

$$1)\ R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow R_2$$

$$2)\ RO^{\cdot}_2 + R^{\cdot} \rightarrow ROOR$$

$$3)\ RO^{\cdot}_2 + RO^{\cdot}_2 \rightarrow \text{неактивные продукты} + O_2.$$

Основной интерес в кинетике этих реакций представляет их развитие в присутствии ингибиторов, так как им принадлежит основная роль в авторегулировании скорости реакции. Изучение кинетики развития окислительных реакций в биолипидах показало, что по кинетическим показателям реакции окисления, развивающиеся в сливочном масле, животном сале и растительных жирах, протекают с кинетическими показателями, характерными для цепных разветвленных реакций, и сверхслабая хемилюминесценция, которой сопровождаются эти химические превращения, воспроизводит типичные для подобных реакций кинетические закономерности.

Факторы, вызывающие возрастание количества радикалов в системе, например действие ионизирующих излучений или добавление к системе перекисей, ускоряют развитие этих реакций. Различные ингибиторы, в основном антиокислители, снижают скорость реакции.

Большое значение для понимания процесса сверхслабой биолюминесценции имеют те теоретические и экспериментальные исследования, которые проводились по кинетике окисления углеводородов в присутствии ингибиторов. Н. Н. Семеновым (1958) было высказано положение, что при некоторой критической концентрации ингибитора должно наступить такое соотношение процессов развития цепей и их обрывов, при котором реакция будет развиваться в стационарном режиме с постоянной скоростью, а при снижении концентрации ингибитора переходить в автоускоренный режим. Это теоретическое положение было экспериментально подтверждено в нескольких исследованиях по окислению углеводородов, например при окислении изопропилбензола в присутствии ингибитора фенола и др. Было также показано, что при ингибировании реакция почти приостанавливается или развивается с очень незначительной постоянной скоростью, при этом происходит расходование ингибитора. Ингибитор, реагируя с высокоактивными зарождающимися радикалами, превращает их в малоактивные соединения и этим обрывает зарождающиеся цепи, сам выходя из строя.

Исследования хемилюминесценции как у растений, так и у животных, показали, что, как правило, интенсивность этого процесса поддерживается очень стабильно и не изменяется во времени. Это показывает, что та окислительная реакция, с которой связана хемилюминесценция, развивается в стационарных условиях. В таких условиях выявить кинетику и природу реакции практически невозможно. Можно предполагать, что эта стационарность достигается благодаря тому, что в хемилюминесцирующем субстрате присутствуют антиоксиданты. Действительно по сверхслабой хемилюминесценции при изучении цепного окисления олеиновой кислоты на воздухе было установлено, что эфирные и алкогольные

экстракты из тканей животных и растений ингибируют это окисление, т. е. содержат антиоксиданты. Было показано также, что если интенсифицировать скорость реакции, ускоряя реакцию окисления путем воздействия, например ионизирующими излучениями или повышением температуры, то количество антиоксидантов уменьшается. Снижение концентрации антиоксидантов на несколько процентов приводит к тому, что хемилюминесценция начинает усиливаться, сигнализируя о том, что стационарное состояние нарушено. Такое же нарушение стационарного равновесия по сверхслабой хемилюминесценции наблюдал В. А. Веселовский (1965) при повышении температуры корешков растений.

Характерная особенность развития сверхслабого излучения после нарушения стационарного состояния состоит в том, что интенсивность излучения нарастает до некоторого предела, пока не израсходован окисляющийся материал. А это говорит о том, что реакция, с которой связано сверхслабое излучение, развивается, вероятнее всего, по типу цепных и принадлежит к автокаталитическим реакциям.

То же самое было подтверждено для гомогенатов мозга и селезенки крыс при воздействии на них гамма-излучением, которое, как известно, является радикалообразующим фактором и сильно ускоряет цепные реакции. При обучении повышающимися дозами интенсивность сверхслабого излучения этих гомогенатов постепенно возрастала, однако при дальнейшем возрастании доз выше 100 000 рентген падала. Это связано с тем, что при таких больших дозах наступало настолько интенсивное окисление и расход субстрата реакции, что после облучения уже не хватало окисляющегося материала. Эти данные лишний раз говорят о том, что сверхслабое биологическое свечение связано с развитием реакций цепного типа.

Обнаружение в данном субстрате химически активных продуктов-радикалов и перекисей служит обычно критерием возникновения активного химического процесса. Многие авторы в связи с проблемой поражения организмов лучистой энергией и для отыскания субстратов, в которых могут возникать радиохимические процессы, проводили исследования с целью обнаружить перекисные соединения в различных тканях организмов. Применяя экстракцию из органов и тканей, им удалось установить, что в бутаноловых экстрактах, извлекающих липидные вещества из тканей, можно выявить незначительное, но вполне измеримое количество липоперекисей. Это количество явно возрастает при облучении организмов ионизирующими излучениями (Мальц, 1960). Ю. Б. Кудряшевым и его сотрудниками (1961) было показано, что при облучении и, в меньшей степени, в норме у животных, особенно в печени, можно обнаружить продукты

окисления липидов — ненасыщенные жирные кислоты и в дальнейшем альдегиды и кетоны.

Эти исследования показали, что липиды обладают значительной способностью к окислению и являются наиболее уязвимым и менее всего надежным материалом среди различных клеточных субстратов. Работы Ю. Б. Кудряшова и его сотрудников еще раз подкрепили точку зрения о том, что хемилюминесценция в основном связана с окислительным излучением в биолипидах. При этом не следует забывать, что липиды служат важнейшим структурным материалом клеток, из которого построены важнейшие микросомальные аппараты клетки.

Присутствие активных радикалов также указывает на наличие активного химического процесса. Определение радикалов в биологических системах является трудной задачей в связи с тем, что в присутствии воды их определение методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) сильно затруднено. Однако можно определить присутствие радикалов другими косвенными методами. В химии для определения радикалов в водных растворах применяется метод полимеризации. При введении мономеров, полимеризующихся по радикальному механизму в систему, где происходит химическая реакция, в ходе которой образуются радикалы, мономеры перехватывают их и полимеризуются; если же в системе уже имеются полимеры, то может произойти сополимеризация или прививка введенного полимера к существующему.

На основе такого принципа была разработана методика для определения радикалов в биологических системах (Козлов, Тарусов, 1961); для этой цели были подобраны инертные в биологическом отношении мономеры акрилнитрилового ряда, которые легко проникали в клетки и не вносили повреждений. Такие мономеры задерживаются в клетках при полимеризации в тех субстратах, в которых происходит образование радикалов. Для количественного учета полимеризовавшегося мономера его молекулы метились радиоактивным изотопом углерода C^{14}. После его фиксации в клетках методом аутографии можно, подсчитывая трэки, определить количество C^{14}. Фракционируя хроматографически полученные из клеток гомогенаты, можно определить и долю радикалов, которые образуются в различных фракциях.

Опираясь на этот метод, было проведено сравнительное исследование интенсивности сверхслабого излучения и образования радикалов в различных органах мышей и крыс при облучении гамма-лучами. Как уже указывалось, ионизирующие излучения усиливают интенсивность сверхслабого излучения. Эти исследования показали, что в норме свободно радикальные состояния обнаруживаются в основном в липи-

дах. При облучении количество радикалов пропорционально возрастает только в липидах (табл. 4).

Таблица 4

Влияние дозы облучения на степень полимеризации акриламида во фракциях гомогенатов мышей (*имп/мин* в 100 *мг* сухого вещества)

Объект исследования, доза, *кр*	Свободные липиды	Связанные липиды	Белки
Печень			
без облучения	892±43	3993±105	378±8
25	953±38	4226±88	370±5
50	1120±93	4366±93	310±20
75	1214±26	4522±90	340±6
100	1305±45	4667±101	321±13
Селезенка	5		
без облучения	512±26	1936±62	189±5
25	675±23	3201±72	168±4
50	693±18	3791±65	139±7
75	695±18	4012±83	146±8
100	705±23	4301±100	136±3
Мозг			
без облучения	965±28	3565±94	768±15
25	1006±18	4763±86	552±12
50	1309±21	6526±103	528±8
75	1328±15	6842±120	510±16
100	1356±20	7020±143	568±14

Примечание: *кр* — килорентген.

Этот опыт показывает, что радикальные реакции развиваются преимущественно в биолипидах клеток, именно при такого типа реакциях должна возникнуть хемилюминесценция. В данном случае мономер акриламида образует с липоперекисными радикалами димер. Параллельные исследования хемилюминесценции тех же органов показали, что она с увеличением дозы также закономерно возрастает, как и количество радикалов в липидах (табл. 5).

Таблица 5

Влияние дозы гамма-облучения на интенсивность хемилюминесценции гомогенатов мышей (*имп*/10 *сек*)

Объект исследования	Доза, *кр*			
	25	50	75	100
Мозг	6500	10 000	13 000	15 000
Печень	6500	10 000	13 000	15 000
Селезенка	2750	3750	8300	10 000

Помимо этого было установлено, что скорость полимеризации акриламида пропорциональна корню квадратному из интенсивности хемилюминесценции, что характерно для свободно радикальных процессов. Эта работа дала основания полагать, что сверхслабая хемилюминесценция отражает кинетику реакции окисления, которая развивается в липидных, в основном структурных фазах клеток и клеточных органоидов. Весьма существенно, что окислительные реакции в жирах развиваются по цепному механизму. В этом отношении липиды организмов не представляют исключение. Изучение кинетики окисления липидов, извлеченных спиртом и эфиром из органов животных, показало, что реакция здесь всегда проходит по цепному механизму с ускорением. В организме она развивается на очень низком уровне; подобный режим, как уже указывалось, можно создать, если реакцию ингибировать антиокислителями и если последним принадлежит основная роль в регулировании ее скорости.

Наблюдения над различными липидами показали, что развитие в них реакции окисления неизменно сопровождается сверхслабой люминесценцией при температурах 10—50° С (табл. 6).

А. И. Журавлев, Ю. Н. Филипов и В. В. Симонов (1964) провели большое исследование по изучению сверхслабого свечения липидов, извлеченных спиртом и эфиром из различных органов человека (табл. 7).

Таблица 6

Интенсивность хемилюминесценции некоторых жиров и биолипидов (в импульсах за 100 *сек/см²*)

Объект исследования	Температура, °С	Фон	Суммарное излучение в области 3800—6000Å
Оливковое масло	60	62±74	490±530
Подсолнечное масло	60	30±35	210±230
Спиртовая вытяжка из печени собаки	60	50±60	190±200
Олеиновая кислота	50	30±42	160±220

Сверхслабое излучение, как и следует ожидать, усиливается при введении перекиси натрия и перекиси бензоила; прибавление же сильных радикальных ингибиторов (β-ионол, нафтол) снижает интенсивность хемилюминесценции.

Таблица 7

Хемилюминесценция биолипидов, извлеченных из различных органов человека (*имп*/10 *сек*)

Объект исследования	Температура, °С					
	20	30	40	50	60	70
Мозг . . .	48—58	100—130	170—190	400—430	800—890	2100—2600
Сердце . .	67—91	130—160	300—430	550—570	1540—1750	—
Печень . .	36—51	49—74	80—120	120—160	210—270	570—68
Почки . . .	63—83	120—150	270—300	430—460	990—1190	—
Олеиновая кислота .	27—35	45—60	76—85	120—160	230—280	—

Некоторыми исследователями высказывалось предположение, что сверхслабое излучение в биологических системах может возникать при разложении перекиси водорода каталазой. Г. А. Попов и Б. Н. Тарусов (1963) обнаружили, что добавление перекиси водорода к свежим гомогенатам различных органов животных вызывает сверхслабую хемилюминесценцию (рис. 11). Они наблюдали чрезвычайно слабое излучение, которое вряд ли можно отнести за счет разложения перекиси водорода, так как повышение концентрации перекиси водорода до довольно значительных цифр не вызывало никаких изменений. В то же время разложение перекиси водорода происходит очень энергично.

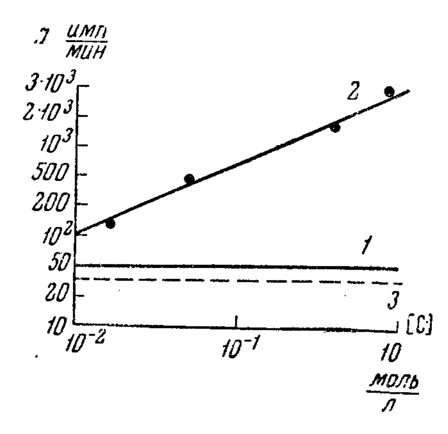


Рис. 11. Хемилюминесценция гомогената печени крысы при добавлении перекиси водорода:

1 — без обработки; *2* — после денатурации; *3* — фон.

При прибавлении перекиси к кратковременно нагретому до 100° С гомогенату, в котором произошла денатурация белка и разрушение липопротеиновых комплексов, возникает довольно значительная хемилюминесценция. Она растет пропорционально концентрации перекиси водорода и превышает фон в 40—50 раз. В то же время интенсивность разложения перекиси водорода идет с гораздо меньшей скоростью, нежели в неденатурированном гомогенате. Однако эта хемилюми-

несценция не является результатом непосредственного распада перекиси водорода. Оказалось, что в данном случае она связана с присутствием кислорода и при откачивании воздуха приостанавливается.

Эти опыты показывают, почему реакции нормального окисления в тканях, связанные с ферментативными превращениями, не дают излучений. В ферментативных реакциях превращения осуществляются на более низких энергетических уровнях, и вероятность появления возбужденных состояний, обладающих таким запасом энергии, при котором они могли бы испустить квант в видимой части спектра, очень мала. При разрушении ферментной системы реакция распада перекисей требует более высокой энергии активации, поэтому эта вероятность повышается.

Таким образом, распад перекиси водорода в живых клетках не может служить источником излучения. В то же время показано, что так же, как и другие перекиси, перекись водорода активирует и усиливает хемилюминесценцию липидов, хотя она и нерастворима в липидной фазе. Эта активация происходит на границе фазы липид-вода. Если на поверхность олеиновой кислоты налить перекись водорода, то интенсивность хемолюминесценции начнет постепенно нарастать. Активация и образование липоперекисных радикалов возникает на поверхности и распространяется в глубину липидной фазы.

IV. РОЛЬ АНТИОКИСЛИТЕЛЕЙ В СВЕРХСЛАБОМ СВЕЧЕНИИ

Тот факт, что реакция окисления, с которой связана хемолюминесценция, протекает очень слабо и с большим постоянством, говорит о том, что в ней участвуют ингибиторы, не позволяющие этой реакции развиваться с самоускорением и достигнуть большой интенсивности. Такими ингибиторами служат антиокислители, которые перехватывают радикалы и снимают их активность или, как сейчас принято говорить, переводят активные радикалы в малоактивные.

О том, что антиоксиданты имеют большое значение для консервации запасенных жиров в клетках покоющихся семян, было известно уже давно. Исследователями было предложено использовать некоторые природные продукты для защиты от окисления жиров. Основная роль антиоксидантов заключается в защите важных липидных структур от разрушения и стабилизации липо-протеинового комплекса, из которого построены различные органоиды клеток. Для поддержания этого комплекса основное значение имеет группа липидов-токоферолов, обладающих антиоксидативными свойствами, к которым относится витамин Е. По каким-то, пока не-

выясненным, причинам высокое содержание этих антиоксидантов, т. е. полное ингибирование реакций, вредно для существования клетки и необходимо некоторое равновесие между количеством естественных антиоксидантов и количеством окисляющихся липидов. Сейчас выдвигается гипотеза о том, что функциональная целостность липидных структур клеток поддерживается двумя факторами: равновесием между антиоксидантами-токоферолами и анти-антиоксидантом, разрушающим токоферолы — витамином А, который также представляет собой липид. Всякое нарушение этого равновесия влечет за собой нарушения функций клеток.

Так как сверхслабое излучение отражает кинетические закономерности протекания окислительных процессов в липидах, регулируемые антиоксидантами, то встает вопрос — в какой мере при помощи измерения кинетических параметров реакции по сверхслабому свечению можно получить информацию о состоянии системы антиоксидантов и нарушениях, там происходящих.

Физико-химические работы по анализу кинетики окислительных реакций в присутствии антиокислителей показали, что при определенных соотношениях окисляющегося вещества и антиокислителя цепная реакция будет медленно развиваться по закону самоускорения A^* с постоянной скоростью, при которой концентрация всех продуктов, участвующих в реакции, должна оставаться постоянной. В условиях же стационарного режима антиокислитель постоянно расходуется, так как в каждом акте взаимодействия молекулы антиокислителя с радикалом происходит гибель и того и другого. В результате реакции концентрация антиокислителя падает. Когда она снизится до критического порога, реакция сразу же переходит в нестационарный режим и начинает автоускоряться; это уже будет переход от нормы к патологии. Эти изменения скорости расходования антиоксиданта в зависимости от условий протекания реакции изучались химической кинетикой. На многочисленных примерах было показано, что реакция в маслах, ингибированная фенилбетанафтилом, оксифениламином и некоторыми другими, позволяет долго хранить продукт, однако после израсходования ингибитора начинается его быстрое разрушение.

Для длительного поддержания стационарного состояния необходимо, чтобы концентрация основных продуктов постоянно возобновлялась. Как известно, в животном организме антиоксиданты не синтезируются. С точки зрения термодинамики подобная система является открытой. В открытых системах должны существовать непрерывные компенсирующие потоки и только при их существовании возможно равновесие.

Основным условием постоянства протекания реакции слу-

жит известное уравнение Пригожина: $\frac{da}{dt}+\frac{db}{dt}=\frac{dA}{dt}$; где a — поток распада, b — поток поступления вещества. Равновесие сохраняется только при равенстве потоков расхода антиоксидантов и поступления их извне. Естественно, что расход антиоксиданта, т. е. величина потока, будет зависеть от скорости реакции, которая развивается при данном стационарном равновесии. Чем выше скорость, тем больше должны быть потоки; наконец, наступает критическая величина расходования, которая уже не сможет компенсироваться притоком. Содержание антиоксидантов в системе будет характеризовать возможности системы поддерживать стационарное состояние, т. е. нормальное функционирование.

Для учета баланса антиоксидантов была сделана попытка оценивать суммарную антиоксидативную активность клеточных липидов с помощью сверхслабого свечения. Для этой цели была использована олеиновая кислота, окисляющаяся в присутствии воздуха. Реакция развивается в олеиновой кислоте по кинетике цепных разветвленных реакций, и в ходе ее возникают перекиси и перекисные радикалы:

$$R^{\cdot}+O_2\rightarrow ROO^{\cdot},\quad ROO^{\cdot}+RH\rightarrow ROOH+R^{\cdot}.$$

При введении антиоксидантов в эту окисляющуюся систему через некоторое время реакция замедляется вследствие того, что антиоксидант, реагируя с радикалами или перекисями, уменьшает их концентрацию:

$$R^{\cdot}+A\rightarrow RH+A^{\cdot}$$
$$ROO^{\cdot}+AH\rightarrow ROOH+A^{\cdot},$$

что отмечается по уменьшению интенсивности сверхслабого излучения олеиновой кислоты.

Это постоянно наблюдалось при действии таких ингибиторов окисления, как цистеин, бетамеркаптоэтиламина, тиомочевины и т. д. Замедление объясняется тем, что образовавшийся здесь радикал $A^{\cdot}$ менее активен, нежели перекисный, и не способен продолжать цепь. Нам во время прохождения реакции удалось обнаружить эффект несколько аномального характера. Через короткий промежуток времени при добавлении порции раствора антиокислителя начинается значительное усиление хемилюминесценции — «вспышка», продолжающаяся от 10 до 30 *мин* при температуре около 50° С; затем начинается снижение свечения и уменьшение скорости окисления. Эта вспышка с различным временным течением наблюдалась при введении в окисляющуюся олеиновую кислоту или окисляющиеся жиры животного и растительного происхождения различных ингибиторов окисления — цистеина, меркаптоэтиламина, некоторых антибиотиков, не содержащих серу, аминов и т. д.

При изучении реакции было установлено, что максимальный выход хемилюминесценции наблюдается тогда, когда при реакции окисления имеется максимальное накопление перекисей и перекисных радикалов (Тхор, 1965). Эти работы несколько дополняют наши представления о механизме сверхслабого свечения биологических систем. Полученные данные говорят о том, что при наличии в липидах антиоксидантов, некоторая часть высвечивания приходится и на их долю. Приходится допустить, что при взаимодействии антиоксиданта с радикалами в окисляющемся субстрате происходит в первом приближении взаимодействие такого характера:

$$R^{\cdot} + AH \rightarrow RH + A^{*1} \rightarrow RH + A + h\nu$$

$$ROO^{\cdot} + AH \rightarrow ROOH + A^{*} \rightarrow ROOH + A + h\nu$$

Более глубокий анализ и сопоставление временных параметров прохождения вспышки при действии антиоксидантов с химическим определением перекисного числа показали, что при возникновении вспышки и во время ее развития перекисное число не меняется, а падение количества перекисей начинается позже. Это говорит о том, что излучательное взаимодействие происходит, вероятно, с радикалами типа R. Такого же рода исследование проведено с липидными экстрактами из тканей печени животных; было обнаружено, что эти экстракты (как спиртовые, так и эфирные) при прибавлении к окисляющейся олеиновой кислоте дают также вспышку такого же временного характера.

При вспышке, которая происходила при прибавлении эфирного экстракта, мы наблюдали ту же картину, которая характерна для реакции с цистеином, бетамеркаптоэтиламином. Антиоксиданты эфирной вытяжки в данном случае ингибируют развитие окислительной реакции в олеиновой кислоте, реагируя с радикалами $R^{\cdot}$. При прибавлении к олеиновой кислоте спиртовой вытяжки из того же органа также наблюдается вспышка, которая развивается в несколько укороченные сроки, но при этом одновременно происходит падение перекисного числа.

Подобные факты говорят о том, что природа антиоксидантов, извлекаемых из липидов эфиром и спиртом, несколько различна. При эфирной экстракции извлекаются ингибиторы радикального типа, при спиртовой вытяжки — ингибиторы перекисей. Необходимо учитывать, что при экстракции эфиром извлекаются свободные липиды тканей, а при экстракции спиртом — связанные липиды, из которых построены липопротеиновые комплексы. Эти исследования позволяют сделать вывод, что антиоксиданты, извлекаемые экстракцией из тканевых липидов, могут быть обнаружены по эффекту вспышки.

---

[1] A^* — радикал в возбужденном состоянии.

В подкрепление этого положения можно еще отметить, что явление вспышки было обнаружено не только in vitro А. Ш. Агавердиев. Б. Н. Тарусов (1965), прибавляя к питательной жидкости корней пшеницы и ячменя антиоксиданты, содержащие серу, установил, что наблюдаемое сверхслабое излучение корней на некоторый промежуток времени усиливается и только после этого происходит эффект торможения излучения.

Это дало основание для того, чтобы применить эффект вспышки для обнаружения антиоксидантов в тканях животных и растений. С помощью такого метода произведено изучение содержания антиоксидантов в различных органах животных и изменение их при патологиях и изменении физиологических условий. Так, в работе А. И. Джофарова (1965) изучалось изменение интенсивности сверхслабого свечения при действии температуры на животные ткани (мышцы, печень, кожа). При этом были обнаружены в основном те же закономерности, как и при изменении температуры у растений (табл. 8).

Здесь при снижении температуры интенсивность свечения также снижалась, и практически ее нельзя было заметить уже при температуре 10° С. Далее при понижении температуры вплоть за замораживания свечение не появлялось. Вспышка закономерно возникала при оттаивании мышцы при плюсовой температуре 3—6° С, дальнейшее же повышение

Таблица 8

Изменения интенсивности сверхслабого свечения мышц белых крыс в зависимости от изменения температуры (*имп/мин*)

Объект исследования	Температура, °С						
	25	20	15	10	5	0	фон
Охлаждение мышцы от 25° до — 10°С	900	590	280	90	90	90	80—110
Оттаивание той же мышцы	1570	920	540	100	320	100	
Оттаивание мышцы с глицерином	980	600	310	140	170	100	
Оттаивание мышцы с цистеамином	200	150	120	100	100	100	

температуры приводило к более интенсивному возрастанию свечения, чем при снижении ее.

У мышц, обработанных глицерином по рецептуре, применяемой при консервировании тканей, предназначенных для пересадки, интенсивность низкотемпературной вспышки при оттаивании значительно ниже, и кривая изменения свечения

при обратном ходе почти совпадает с кривой, полученной при снижении температуры. При обработке ткани цистеамином, являющимся, как известно, ингибитором окислительных реакций, свечение почти полностью гасится.

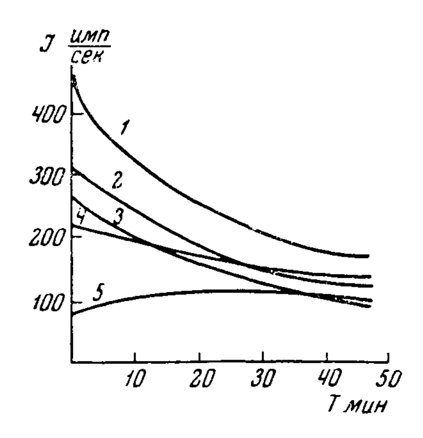


Рис. 12. Хемилюминесценция липидов из соединительной ткани рыб:

1 — горбуша; *2* — кета; *3* — нерка; *4* — карп; *5* — контроль (олеиновая кислота); *I* — интенсивность хемилюминесценции; *T* — время

Эти наблюдения дают информацию о том, что разрушение структуры липопротеинов в мышечной ткани происходит не при замораживании, как у растений, а при обратном оттаивании. И как у растений, вспышка, наблюдающаяся при низких температурах, обусловлена окислительными реакциями.

В работах ряда исследователей (Бурдин, Пархоменко, Петрусевич, 1964) использовался эффект тушения сверхслабого излучения тирозина в электрохимической ячейке, что позволило количественно дифференцировать защитную антиоксидативную мощность препаратов профилактического действия и дифференцировать радикальные ингибиторы от пероксидных (рис. 13).

При действии повреждающих агентов, например ионизирующих излучений, происходящее усиление свечения сопровождается повышением расхода антиоксидантов, последнее увеличивается также при росте и клеточном делении.

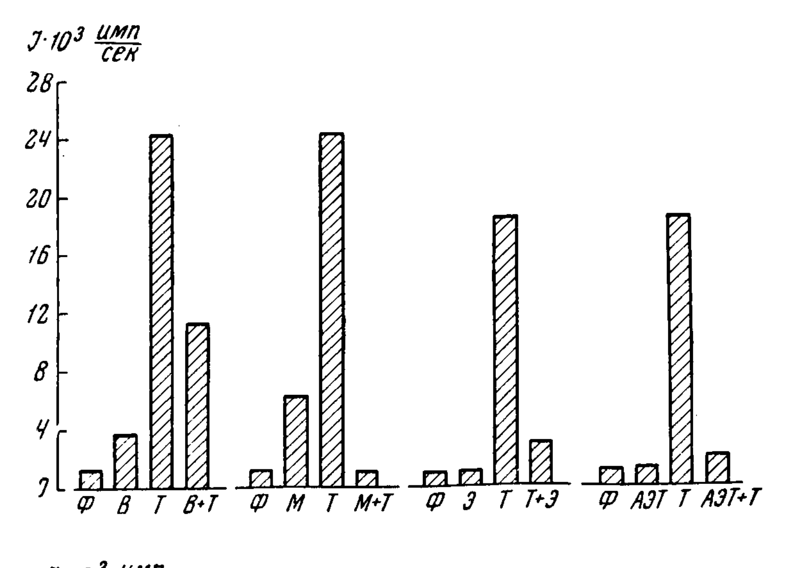
На этом основании А. И. Журавлевым и В. П. Корженко (1963) была выдвинута концепция, что у тех животных, у которых происходит интенсивный рост и деление клеток, должно быть повышенное содержание антиоксидантов в липидах. Интенсивность роста, согласно этому предположению, может повышаться только тогда, когда есть запас антиоксидантов, который может компенсировать их повышенный расход. Это вполне логично с точки зрения термодинамики открытых систем. В любых физиологических условиях клетка будет функционировать нормально, если реакции в ней будут развиваться стационарно. Способность клеток приспосабливаться к экстермальным условиям зависит от того, в какой мере и в каких пределах она сможет переходить на другие стационарные уровни, особенно на высшие, когда стационарный уро-

вень осуществляется на повышенных скоростях реакций. При повышенном росте скорости реакций возрастают, и возможность осуществления данного уровня связывается и ограничивается той предельной скоростью, на которой организм сможет удержать стационарность. Присутствие большого количества антиоксидантов, естественно, расширяет пределы авторегулирования и позволяет выше поднять скорость реакций, не нарушая стационарности.

Действительно, А. И. Журавлев и В. П. Корженков, на основании изучения хемилюминесценции по вспышке у рыб с различной скоростью роста — горбуши, кеты, нерки, карпа, установили, что скорость роста явно коррелирует с содержанием антиоксидантов в тканевых липидах (рис. 12).

Интересные исследования были проделаны Ю. М. Петрусевичем и Ю. П. Козловым, изучившим хемилюминесцентным методом расход антиоксидантов при изменении осмотических условий у морских организмов. Ими установлено, что при понижении осмотического давления в яйцах морского ежа происходит повышенный расход и снижение количества антиоксидантов, в результате израсходования антиоксидантов происходит гибель животных. Морские ежи, как известно, относятся к организмам, плохо переносящим опреснение морской воды. У формы более устойчивой к опреснению — актинии (*Actinia equina*), процент израсходования антиоксидантов протекал при изменении осмотического давления медленнее. Сравнительное исследование организмов с различной способностью выдерживать опреснение и переходить из моря в реки показало, что у организмов, способных осуществлять такой переход, антиоксидативный индекс значительно выше.

На важность антиоксидантов в поддержании стационарного окисления и защите липидных структур от окисления указывает и исследование И. И. Иванова, Ю. М. Петрусевича (1965), в котором при изучении вспышки хемилюминесценции в олеиновой кислоте было установлено, что в плазме крови животных существует некоторое постоянное количество антиоксидантов. Это говорит о том, что в норме в организме существует постоянный поток антиоксидантов, поставляющий их в клетки. Во всяком случае уже сейчас можно сказать, что сверхслабое свечение связано с окислительной реакцией в липидах, стационарный уровень которой регулируется антиоксидантами. Поэтому сверхслабое излучение и методы, построенные на его использовании для оценки радикальных процессов, могут дать очень ценную информацию о состоянии антиоксидативной системы тогда, когда применение непосредственных химических методов невозможно.



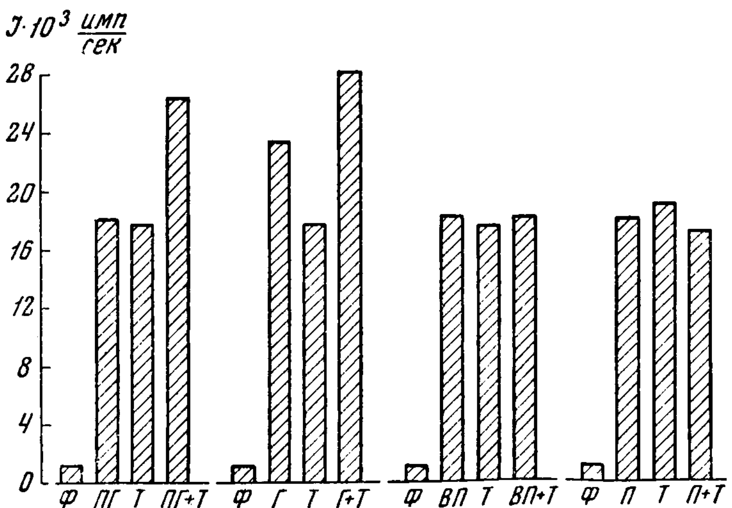


Рис. 13. Ингибиторы хемилюминесценции и вещества, обладающие радиационно-защитным действием:

В — веронал 5 *мг/мл*; *М* — мединал 5 *мг/мл*; *Э* — эвипол 2,5 *мг/мл*; *АЭТ* — α-аминоизотиуроний 40 *мг/мл*; *П* — пропилгаллат 12 *мг/мл*; *г* — грамицидин 100 *мг/мл*; *в* — винилпиралидон 1%; *П* — пиридин 0,005%; *Ф* — фон, *Т* — тирозин

V. СВЕРХСЛАБАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ РАСТЕНИЙ

В 1955 г., использовав высокочувствительный фотоумножитель с охлаждением, Л. Коли и его сотрудники (Colli et al. 1955) обнаружили сверхслабое свечение корешков растений. Однако они не изучили природу этого свечения. Применив весьма чувствительную методику для измерения сверхслабых световых потоков, наши советские исследователи показали, что это излучение действительно существует и испускается корневыми волосками всех растений.

Анализ механизма этого излучения в основном проводился на корнях злаковых растений (пшеницы, ячменя различных сортов). Для этой цели семена в течение нескольких дней в оптимальных условиях температуры проращивались в кристаллизаторе с определенной поверхностью до тех пор, пока корни не образовывали сплошной массы и заполняли всю поверхность. Затем сосуд с корнями помещали в специальную влажную камеру, в которой можно было регулировать температуру в пределах от —8 до 50° С. Через камеру постоянно пропускался воздух или газовые смеси, в которых содержание кислорода и углекислоты колебалось от 1 до 98%. Кроме того, с помощью электротермометров (термисторов) регистрировалась непосредственно температура корней.

С помощью камеры с прозрачной передней стенкой, которая располагалась против фотокатода фотоумножителя, была показана возможность достоверной регистрации сверхслабого излучения с поверхности 10 *см*² даже при температурах, близких к нулевым. При повышении температуры излучение усиливалось и, например, при 16—18° С, измеряемое с помощью современного фотоумножителя ФЭУ-42 оно превышало фон в 5—6 раз (Веселовский, 1965).

Изучение спектра излучения корней растений, проведенное с помощью светофильтров, показало, что оно (как и у животных тканей) лежит в широкой области видимого спектра, не распространяясь в область ультрафиолета. Было обнаружено, что интенсивность свечения зависит от парциального давления кислорода. Однако отмеченная зависимость нелинейна — сильное снижение интенсивности свечения происходило тогда, когда парциальное давление кислорода снижалось до 0,5% и ниже; в интервале же от 30—100% интенсивность свечения практически не зависела от концентрации кислорода.

Эта своеобразная зависимость скорости реакции от содержания кислорода, когда наблюдается пороговая зависимость, очень напоминает аномальную зависимость скорости реакции от давления кислорода, характерную для цепных вырожденно-разветвленных реакций, реакций окисления в липидах.

Также удалось выявить, что интенсивность излучения увеличивается при повышении температуры, а энергия активации этого процесса такого же порядка, как и при химических реакциях.

Все это позволяет сделать вывод, что сверхслабое излучение корней растений представляет собой хемилюминесценцию такого же типа, как и у животных тканей. Постоянство этого свечения во времени и стабильность его показывают, что оно также излучается в реакциях, протекающих в стационарном режиме.

Наряду с этим излучением, почти одновременно, Б. Стреллером (Strehler, 1961) было обнаружено также послесвечение, которое индуцировалось в зеленых листьях растений облучением их видимым светом. Некоторыми авторами были выдвинуты гипотезы, объясняющие это послесвечение чисто физическим процессом запасания энергии триплетными состояниями при освещении и последующим высвечиванием (так этот процесс можно объяснить, исходя из теории полупроводников). Однако работами Ю. А. Владимирова, Ф. Ф. Литвина (1965) и А. А. Красновского (1963), анализировавших послесвечение хлоропластов, установлено, что это послесвечение может зависить от температуры и присутствия кислорода. Кроме того, был обнаружен эффект послесвечения (хемилюминесценции) хлорофилла в растворе, наблюдавшийся в ходе окисления кислородом фотовосстановленных форм хлорофилла. Полученные данные позволили придти к выводу, что длительное послесвечение и термолюминесценция хлорофилла в хлоропластах обусловлены не запасанием энергии в электронных ловушках, а процессами хемилюминесценции фотопродуктов хлорофилла. Эксперименты показали, что ответственным за хемилюминесценцию растворов хлорофилла, по-видимому, является конечный продукт фотовосстановления, а также что сверхслабое свечение связано с окислительными фотореакциями хлорофилла.

На основании полученных результатов можно предположить, что одним из механизмов длительного послесвечения фотосинтезирующих организмов может быть хемилюминесценция, возникающая в ходе процессов, обратных фотосинтезу и идущих с участием фотопродуктов хлорофилла. Это излучение хотя и является хемилюминесценцией, но развивается на ином субстрате и по кинетике другого типа, которая пока еще не расшифрована. Уже сейчас удалось осуществить исследования (Владимиров, Литвин, 1959) для выяснения того, какая именно нативная форма хлорофилла ответственна за свечение при фотосинтезе и каким образом эта способность связана с развитием структуры фотосинтетического аппарата и накоплением пигментов.

Для решения этой проблемы было прослежено изменение

интенсивности длительного сверхслабого свечения в ходе зеленения этиолированных листьев растений. Результаты исследований показали, что способностью к послесвечению обладают этиолированные листья даже после первых минут освещения, когда концентрации хлорофилла в них в десятки и сотни раз меньше, нежели во взрослых листьях. Способность к послесвечению возрастает с увеличением количества хлорофилла. Однако усиление интенсивности свечения пропорционально не общей концентрации пигмента, а концентрации его длинноволновой формы.

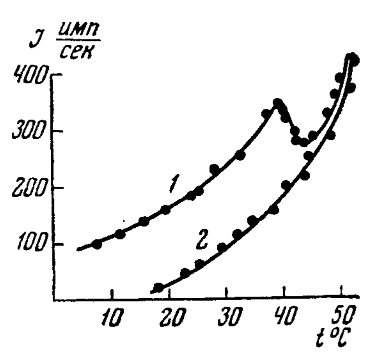


Рис. 14. Зависимость хемилюминесценции корней растений от температуры:

1 — живые корни; *2* — убитые корни; *I* — интенсивность хемилюминесценции; *t°* — температура

Вышеуказанное послесвечение легко отличимо от сверхслабого стационарного. Оно совершенно исчезает у растений, которые выдержаны, хотя бы полчаса, в темноте.

Исследование кинетических закономерностей сверхслабого стационарного излучения корешков злаковых показало, что оно зависит от температуры при этом. С повышением температуры интенсивность излучения увеличивалась, а при понижении падала. Было установлено, что закономерное возрастание сверхслабого свечения с повышением температуры продолжается только до некоторого критического порога, который лежит около 40° С, дальнейшее же повышение температуры не приводит к увеличению интенсивности излучения и, наоборот, начинается спад, который только после некоторого дополнительного прогрева сменяется быстрым подъемом скорости реакции, развивающейся с самоускорением (рис. 14).

Сверхслабое свечение можно наблюдать и на убитых нагреванием корешках, однако изменение в зависимости от температуры интенсивности такого сверхслабого излучения носило другой характер и было значительно проще. Ускорение свечения при повышении температуры шло по типу простой автокаталитической реакции, развивающейся по закону самоускорения. По-видимому, здесь к цепной реакции окисления липидов присоединялась при более высоких температурах реакция окисления углеводов — целлюлозы, которая также развивалась по цепному механизму. Такая реакция действительно происходит при повышении температуры на чистой целлюлозе и сопровождается сверхслабой хемилюминесценцией.

Если в любой точке температурной кривой приостановить повышение температуры и длительно удерживать ее, то свечение сохраняется и не зависит от времени. Это говорит о том, что при этих температурах происходят переходы на другие стационарные уровни. Скорость реакции при переходе от 15 до 25° С ускоряется, весь процесс идет быстрее, но система авторегулируется, и удерживается стационарный режим, хотя расход антиоксидантов явно повышен. После поднятия температуры выше критической точки интенсивность излучения будет непрерывно нарастать по закону самоускорения. Такое состояние реакции сигнализирует о том, что система уже не в состоянии осуществлять стационарный режим, а это происходит в том случае, если при возрастающих скоростях реакции идет настолько интенсивный распад антиоксидантов, который не может компенсироваться их притоком. Система при этих температурах выходит за рамки авторегулирования.

Все перечисленные факты говорят о том, что реакция окисления липидов, с которой связано сверхслабое свечение, может развиваться в стационарном режиме только в определенных температурных границах, совпадающих с температурными границами жизни. Поэтому у нас возникло предположение, что температурные границы возможности существования жизни определяются наличием стационарного равновесия в реакции окисления структурных липидов, и это стационарное равновесие предохраняет их от разрушения.

Так как механизм авторегулирования заключается в возможности ингибирования реакции, то проблема сводится к изучению баланса антиоксидантов. Если их расход становится больше поступления, то скорость реакции начинает возрастать и структурные липиды клеток интенсивно окисляются. Этот процесс, вероятнее всего, оказывает наибольшее влияние на биологические свойства клеточных структур; когда он развивается в липопротеиновых комплексах, то приводит их к необратимому разрушению.

В связи с этим следует вспомнить, что температурная чувствительность растений связана с разрушением липидных структур клеток. Было установлено, что растения холодного и жаркого климата отличаются по составу своих жиров. Чем выносливее растение к повышенным температурам, тем их липиды содержат большее количество ненасыщенных жирных кислот. С содержанием жирных кислот и степенью их насыщенности связана реакционная способность липидов. У растений жаркого климата в состав структурных липидов должны входить липиды с пониженной реакционной способностью, так как только при этом условии их комплексные полимеры будут устойчивы по отношению к нагреванию. У холодолюбивых растений — наоборот.

В связи с этим возник вопрос, не отражает ли сверхслабое свечение растительных клеток корней реакционную способность липидов, которые входят в состав липопротеиновых комплексов, и нельзя ли по критической точке на кривой температурной зависимости получить информацию о способности данного растения жить в условиях различных географических зон? Этот показатель мог бы быть весьма полезным, например, для отбора требуемых экземпляров селекционерами. Были проведены исследования по изучению температурных характеристик корневых систем растений, отличающихся по своей большей (кукуруза, подсолнечник, хлопчатник, арбуз, дыня) и меньшей термоустойчивости (пшеницы северные и южные, ячмень, бобы и т. д.).

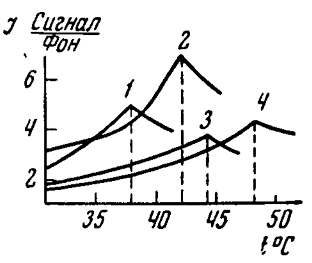


Рис. 15. Действие повышенных температур на хемилюминесценцию различных культур:

1 — пшеница Лютесценс 329; 2 — ячмень Нахичеванданы; 3 — кукуруза Стерлинг; 4 — хлопок АП-1; I — интенсивность хемилюминесценции; t° — температура

Эти данные показали, что пик на температурной диаграмме располагается различно в зависимости от температурной устойчивости растений (Р. А. Гасанов, 1963). У южных форм растений с повышенной температурной устойчивостью критический пик появляется при более высоких температурах, у холодолюбивых — при более низких (рис 15). Это говорит о том, что температурная устойчивость растений связана со способностью удерживать в каком-то интервале температур стационарность в реакциях окисления структурных липидов клеток. Предельная же температура, при которой возможно существование структурных липидов, определяется реакционными свойствами последних. Наблюдения над различными растениями показали, что максимум свечения, например у холодолюбивой формы пшеницы Лютесценс 329, наблюдается при 38° С, а у хлопчатника, произрастающего в Азербайджане,— при 48° С. Как было установлено в данном исследовании, это не единственное отличие теплолюбивых и холодолюбивых растений; они также различаются по кинетике изменения интенсивности сверхслабого свечения, когда происходит переход от одной температуры к другой. У теплолюбивых растений — термоустойчивых — переход в новое стационарное состояние происходит очень быстро при повышении температуры (в пределах оптимальных температур); у холодолюбивых, также в пределах оптимальных температур, стационарное состояние устанавливается медленнее и после некоторого латентного периода.

Эта кинетическая закономерность представляет интерес для понимания механизма температурной устойчивости; она показывает, что у термоустойчивых видов имеется более мощная антиокислительная система, которая в большей мере препятствует переходу с одного уровня на другой. Р. А. Гасанов провел широкое исследование с целью выяснить, в какой мере термоустойчивость различных видов в природе коррелирует с положением температурного пика.

Эти наблюдения показывают, что не только виды с различной термоустойчивостью, но и сорта одного вида (южные и северные), отличающиеся по зонам своего распространения, четко различимы на температурной диаграмме сверхслабого свечения. Их температурную характеристику можно быстро определить с точностью до одного градуса по положению критической переломной точки (пика). Быстрота, с которой может быть снята подобная характеристика (2 часа), дает основание полагать, что этот прием мог бы найти практическое применение. Что же происходит, когда растение приспосабливается к условиям повышенных температур? Здесь, судя по полученной информации о сверхслабом свечении и исходя из ранее известных биохимических данных о роли состава жиров в температурной устойчивости растений, должна, в первую очередь, иметь значение реакционная способность липидов клеток. Она должна быть ниже у термоустойчивых растений, чем у холодоустойчивых, и окислительные процессы в их липидах (скорости реакций при равных температурах) должны развиваться с меньшей интенсивностью. Реакционная же способность липидной системы определяется, с одной стороны, окислительной реакционной способностью самого липида в зависимости от количества двойных связей в молекуле; она понижается с возрастанием длины углеродной цепи: олеиновая, пальмитиновая, стеариновая и т. д. С другой стороны, реакционная способность понижается с возрастанием в липидах примесей — антиоксидантов.

Для разрешения этого вопроса были поставлены опыты по выяснению влияния введения антиоксидантов на положение температурного пика. Для этого в питательный раствор, в котором находились корни растения, вводились хорошо известные антиоксиданты — цистеин и цистеоамин, замедляющие скорость окисления в липидных системах in vitro. В первый момент в корнях растений после прибавления антиоксиданта наблюдалась кратковременная вспышка. В опытах мы использовали ячмень — сорт Нутанс 226, у которого пик излучения лежал при 39° С. При обработке корней цистеином в концентрации 10^{-3} *моль/л,* максимум излучения смещался к 43° С. При обработке корней раствором такой же концентрации цистеоамином — к 42° С. Таким образом, удалось в кратковременном опыте с помощью антиоксидантов повысить тем-

пературную устойчивость растения, снизив реакционную способность биолипидов.

Как известно, существуют определенные методы для повышения температурной устойчивости растений. Наиболее известный из них, так называемый метод закалки проростков. Для этого молодые проростки помещают в термостат и несколько часов выдерживают в режиме постепенно повышающейся температуры от 35° до 42° и выше. Подобный опыт мы проделали с проростками ячменя Нутанс 226 и выяснили, что после такой обработки критический температурный пик сдвинулся с 39° до 42°. Очевидно, что при закалке произошло и снижение реакционной способности клеточных липидов. Наблюдения над балансом антиоксидантов при действии различных повреждающих воздействий, вызывающих образование радикалов и ускорение окисления липидов, показало, что при постепенном действии небольших доз этих факторов в клетках происходит мобилизация антиоксидантов. Это приводит к тому, что их количество, несмотря на некоторое повышение расхода, увеличивается. Подобное повышение, очевидно, можно трактовать как механизм биологической адаптации, наблюдающийся, например, при действии слабых доз рентгеновского излучения; весьма вероятно, что этот же механизм имеет место и при температурной закалке растений.

Попытки уловить сверхслабую спонтанную хемилюминесценцию от зеленых листьев и проростков растений в сине-зеленой части спектра не удались. Однако было показано (Агавердиев, Тарусов, 1965), что этилированные проростки различных пшениц, ячменя и хлопка излучают сверхслабое свечение в сине-зеленой части спектра так же, как и корни, и не меньшей интенсивности. При освещении таких проростков и образовании хлорофилла излучение исчезает. Это еще раз показывает, что сверхслабое свечение характерно для всех клеток, но может маскироваться. В присутствии хлорофилла или других пигментов происходит переход возбужденного состояния от излучающей молекулы липида на молекулу пигмента. При этом может наблюдаться либо активация излучения с переходом в область спектра, характерного для молекулы активатора, либо тушение. Происходит ли при этом переход спектра сверхслабого излучения в область излучения хлорофилла или его тушение, пока сказать определенно нельзя.

С проростков злаковых были сняты точно такие же температурные характеристики, как и с корней тех же растений. В этих опытах был получен тот же характерный температурный пик предельно допустимой высокой температуры для растения. В некоторых отношениях метод снятия температурных характеристик с проростков растений удобнее.

Путем регистрации сверхслабого свечения с проростков были сняты температурные характеристики некоторых сельскохозяйственных растений (табл. 9).

Таблица 9

Температурный максимум хемилюминесценции проростков злаковых

Объект исследования	Температура пика, °C	Характеристика
Пшеница 329	38	озимая пшеница средней полосы европейской части СССР
Ячмень Нахичеван	46	южная полоса европейской части СССР
Пшеница Аран-даны	47	Средняя Азия
„ Новоукраинка . . .	43	Украина, Киевская обл.
„ Горные формы . .	43	Целинный край
Ячмень Винер	39	Московская обл.
„ Трэби	46	Средняя Азия

При переходе к низким температурам сверхслабое излучение ослабевает и при температурах 10—0° С перестает быть заметным. Это ослабление свечения развивается различно в зависимости от термоустойчивости растения. У термоустойчивых растений это излучение перестает регистрироваться при более высоких температурах; у северных же растений — при более низких. Так, например, у проростков южного сорта пшеницы Трэби из Средней Азии излучение прекращалось при 9° С, в то же время проростки подмосковной пшеницы Винер прекращали свечение только при 2° С. Уже по этому поведению сверхслабого свечения можно явно оценить степень холодоустойчивости данного сорта.

При этих исследованиях Г. Агавердиеву удалось установить очень интересный факт. При снижении температуры сверхслабая хемилюминесценция ослабляется и в конце концов становится настолько незначительной, что не улавливается больше регистрирующими приборами. Но при дальнейшем снижении температуры до 0° С (или ниже) снова появляется свечение, которое достигает максимума около точки замерзания. Естественно было предположить, что это свечение физического характера и возникает оно при фазовом переходе воды в лед. Однако поставленные опыты с водными растворами показали, что при замерзании никакого выделения энергии в виде световых квантов не происходит. В то же время выяснилось, что свечение не бывает, если проростки выдерживаются в атмосфере гелия или азота. Одновременно было установлено, что свечение изменяется и ослабляется, если в

питательную среду перед изменением температуры вводятся такие антиоксиданты, как цистеин и изотиоуроний. Это показывает, что при низких температурах, перед гибелью растения, вновь происходит вспышка того процесса, который угас при более высокой температуре. Однако это странный, казалось бы, факт получил подкрепление и пояснение в парадоксальном явлении, которое было обнаружено на кафедре физиологии растений Московского университета проф. Беликовым и его сотрудниками. Они обнаружили, что при снижении температуры закономерно происходит постепенное снижение дыхания проростков картофеля и около нулевых температур оно приостанавливается. При дальнейшем понижении температуры ниже 0° С оно вдруг дает «вспышку» — снова на некоторый промежуток времени возрастает потребление кислорода. Похоже, что в основе наблюдавшегося эффекта «вспышки» дыхания и теми данными, которые были получены при помощи сверхслабого свечения, имеется определенная связь.

Вероятнее всего, что эта вспышка происходит вследствие нарушения целостности биологических структур: при повреждении их холодом возникает контакт между химическими компонентами, которые ранее были геометрически разделены друг от друга. Возможно, это контакт между законсервированными радикалами или перекисями, активирующими реакцию окисления в структурных липидах; может быть контакт окислительных радикалов с антиоксидантами. Во всяком случае влияние на вспышку введения антиоксидантов говорит о какой-то связи реакции с ними (рис. 16). Эта вспышка хемилюминесценции при низких температурах сигнализирует нам о том, что основные структуры растения находятся на грани необратимой гибели. Об этом очень убедительно говорит опыт по изучению обратимости процесса свечения (рис. 17).

Если до вспышки прекратить понижение температуры и опять медленно ее повышать, то сверхслабое свечение с какой-то характерной для него температурной точки начинает снова возрастать и кривая его обратного нарастания точно совпадает, накладывается на кривую, полученную при снижении температуры, т. е. явление оказывается обратимым. То же самое происходит, если проследить обратный ход низкотемпературного свечения. Если же начать повышение температуры после максимума вспышки, то кривая обратного температурного хода не совпадает с кривой снижения температуры.

При обратном нарастании температуры высвечивание гораздо выше и развивается явно с самоускорением. Если в какой-то точке приостановить повышение температуры, то реакция не приостанавливается, а ускоряется непрерывно. Это показывает, что реакция не может существовать в ста-

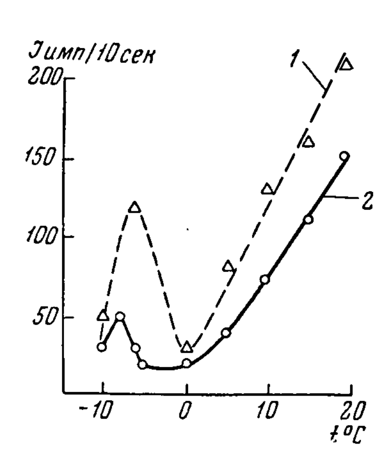


Рис. 16. Подавление пропилгаллатом низкотемпературной вспышки сверхслабого свечения проростков растений:

1 — контроль; *2* — после обработки $5 \cdot 10^{-4}$ *м* раствором пропилгаллата:

I — интенсивность хемилюминесценции; *t*° — температура

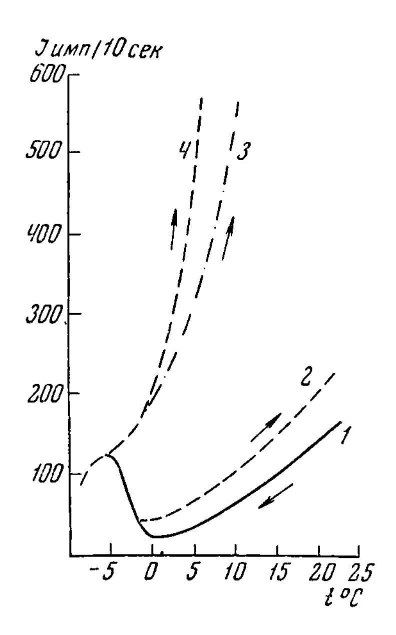


Рис. 17. Соотношение интенсивностей биохемилюминесценции растений, доведенных и не доведенных до нижней критической точки гибели:

1 — измерено при понижении температуры; *2, 3* — интенсивность свечения растений, не доведенных (*2*) и доведенных (*3*) до нижней критической точки гибели при обратном повышении температуры; *4* — интенсивность свечения проростков, предварительно убитых холодом. Стрелками указано направления изменения температуры

ционарном режиме, ибо механизм авторегулирования необратимо поврежден. Так как фактором, обеспечивающим авторегулирование скорости реакции при окислении структурных липидов, служат антиокислители, то вышеприведенные факты говорят о том, что при низких температурах происходит или повреждение антиоксидантов и даже их разрушение, или разобщение от того субстрата, на который они действовали.

Во всяком случае кривая хемилюминесценции при обратном ходе после вспышки показывает, что реакция протекает без ингибитора. Известны попытки различными методами не-

сколько снизить температуру гибели растений; так, например, вводят вместе с питательным раствором вещества, повышающие осмотическое давление и соответственно точку замерзания. Сочетая эти опыты с изучением сверхслабого свечения, удалось показать, что при небольших сдвигах, снижения замерзания и повышения морозоустойчивости растений на два-три градуса, хемилюминесценция четко регистрирует этот сдвиг, показывая тем самым, что здесь происходит сдвиг максимума низкотемпературной вспышки к более низким температурам.

Анализ данных, полученных при помощи сверхслабого свечения, показывает, что в механизме холодоустойчивости растений имеются две критические точки. Первая точка, в зависимости от холодоустойчивости растения, лежит в пределах от 0° до —9° С и характеризуется прекращением сверхслабого свечения. Такая температура не производит резкого повреждающего действия на клетки растений, но длительное существование растения в этих условиях невозможно, и повреждающее действие проявляется уже через несколько часов. Вторая точка выявляется по низкотемпературной вспышке; она характеризует резкое повреждающее воздействие, при котором гибель растения наступает через очень короткий промежуток времени.

В последнее время были опубликованы новые работы о природе сверхслабого излучения в растениях. Исследования по связи сверхслабого свечения с физиологическими особенностями показали, что интенсивнее светят молодые проростки и наибольшее излучение наблюдается в зоне интенсивного клеточного деления. Максимальная доля общего излучения, испускаемого корневой системой — 70—80%, приходится на корневые волоски. Обогащение питательного раствора углеводами совершенно не влияло на интенсивность сверхслабого свечения. Исключение же из питательного раствора фосфора и азота снижало интенсивность люминесценции на 25%. Явное влияние на интенсивность свечения оказывает pH питательного раствора. Так, например, при культивировании в водной культуре проростков ячменя и пшеницы излучение при увеличении щелочности раствора возрастало до 9 pH для первого и 8 pH для второй. Эти изменения интенсивности сверхслабого свечения были обратимы и при подкислении раствора возвращались к норме.

Для объяснения природы сверхслабого свечения растений интересны данные, полученные при изучении влияния парциального давления кислорода на этот феномен. Здесь была отмечена такая же зависимость, как и для животных тканей. При низких концентрациях кислорода наблюдалась пропорциональность между интенсивностью свечения и давлением кислорода. При повышении концентрации выше 20% появлял-

ся резкий перелом, а в дальнейшем, при повышении давления кислорода, интенсивность свечения не изменялась. Эта зависимость дает основание полагать, что здесь имеется порог, характерный для вырожденно разветвленных цепных реакций.

При пропускании через питательный раствор обогащенного углекислотой воздуха было показано, что уже при 10%-ной концентрации начинается ослабление свечения, а растворы, содержащие 50% углекислоты, полностью его тушат. Однако если давать смесь — оптимальную концентрацию кислорода (20%) и углекислоты (80%), то свечение развивается нормально. Эти опыты позволяют говорить о том, что прямой связи свечения с процессом дыхания нет, а существуют лишь косвенное влияние. Основным фактором, определяющим свечение, служит концентрация кислорода.

В работе Р. Гасанова (1963) изучалось влияние цианистого калия на процесс дыхания и на интенсивность сверхслабого свечения. Было показано, что тогда, когда цианистый калий на 70% подавляет дыхание, он совершенно не влияет на интенсивность сверхслабого свечения. Как известно, цианистый калий является парализатором цитохромной системы, подавляя ее. Поставленный Р. А. Гасановым опыт прямо указывает на то, что между дыхательными системами и сверхслабым свечением связи нет.

Были попытки доказать участие в этом процессе липооксидаз. Для этой цели применялся ингибитор — калий перманганат, который тормозит действие липооксидаз. Действительно, было установлено, что при прибавлении перманганата в питательную среду сильно ослабляется сверхслабое свечение корешков ячменя. Однако это вряд ли может говорить о роли липооксидаз в этом процессе. Перманганат, будучи сильным окислителем жирных кислот, ингибирует и нарушает развитие окислительной реакции в липидах неферментативного характера. Высокая энергия активации хемилюминесценции показывает, что она не связана с какой-либо ферментативной реакцией. Кроме того, аргументом в пользу того, что липооксидаза на сверхслабое свечение влияния не имеет служит тот факт, что действие липооксидазы, как и других ферментов, имеет оптимум при 30° С. Хемилюминесценция же в пределах жизненных границ оптимума не имеет и закономерно растет с повышением температуры до резкого срыва.

VI. ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ

Всякий фактор, который способен индуцировать непосредственно образование радикалов в субстрате, где развивается окислительная реакция, ускоряет развитие этой реакции и естественно повышает скорость расходования антиоксидантов.

Уже давно высказывалось соображение, что одним из основных мест, где индуцируются и ускоряются окислительные реакции при действии ионизирующих излучений, являются липидные структуры клеток, так как в реакционном отношении они наиболее уязвимы. Такие реакции могут возникать самопроизвольно. При действии подобного типа химически активных излучений на различные жиры происходит образование радикалов и перекисей и реакции обычно даже от небольших доз сильно ускоряются. На основании модельных опытов с окислением липидов, извлеченных из организмов, было показано, что ионизирующие излучения также стимулируют развитие окислительной реакции и в липидах тканей. Еще больше это подтверждает тот факт, что у облученных животных обнаруживается значительное увеличение перекисных соединений в липидах после облучения.

Это привело исследователей к мысли о том, что при действии излучений в результате повышения скорости окисления липидов происходит сдвиг стационарного равновесия и повышение расходования антиоксидантов. Высказывалось даже соображение, что ионизирующие излучения могут индуцировать автономную реакцию окисления в самих антиоксидантах. При смертельных дозах может возникнуть такое сильное разрушение антиоксидантов, при котором стационарное равновесие становится невозможным. Подобный механизм, очевидно, имеет широкое распространение у всех организмов.

Обнаружение сверхслабого излучения от органов животных и растений и тот факт, что это излучение представляет собой хемилюминесценцию, которая сопровождает реакции окисления в биолипидах, давали возможность непосредственно изучить физико-химический процесс окисления в клетках и гомогенатах живых организмов.

В опыте, в котором изучалось сверхслабое излучение печени живых мышей и крыс при вскрытой брюшной полости, были проведены (в сравнительном эксперименте) исследования интенсивности сверхслабого свечения органов облученных животных. Было обнаружено, что после облучения, особенно через несколько дней, интенсивность излучения заметно возрастает (табл. 10).

Изучение свечения гомогенатов показало, что с повышением температуры эффект облучения заметно усиливается и сверхслабое излучение сильно возрастает. В липидах же контрольных необлученных организмов изменения, связанные с повышением температуры, не так велики.

При сравнительном изучении интенсивности сверхслабого излучения гомогенатов мозга, печени и селезенки мышей было показано, что интенсивность сверхслабого излучения закономерно возрастает с увеличением дозы облучения (табл. 11).

Таблица 10

Хемилюминесценция биолипидов, извлеченных из печени животных при облучении рентгеновскими лучами

Объект исследования	Доза облучения, *кр*	Фон	Интенсивность свечения, *имп/мин*	Темпера-тура, °С
Печень мышей	контроль (без облучения)	20—30	100—150	38
	доза 700 *кр*	20—30	160—250	38
Печень собак	контроль	60—80	305—340	50
	доза 700 *кр*	60—80	1800—2050	50
Гомогенат печени крыс	контроль	20—30	200—320	38
	доза 700 *кр*	20—30	1300—1700	38

Таблица 11

Влияние дозы гамма-облучения на интенсивность хемилюминесцении гомогенатов разных органов мышей

Гомогенат	Доза облучения, *кр*			
	25	50	75	100
	интенсивность свечения, *имп*/10 /*сек*			
Мозг	6500	10 000	13 000	15 000
Печень	6500	10 000	13 000	15 000
Селезенка	2750	3750	8300	10 000

Наибольшей интенсивностью излучения обладают ткани мозга. Это вполне естественно, так как в них содержится наибольшее количество фосфолипидов и липидных антиоксидантов.

На основании излучения количественных закономерностей изменения сверхслабого свечения от облученных тканей Ю. П. Козлов (Козлов, Тарусов, 1961) вывел общую закономерность расхода антиоксидантов в зависимости от интенсивности облучения:

$$\frac{A_0}{\overrightarrow{A_t}} = KC^2,$$

где A — концентрация антиоксиданта; t — время; K — константа и C — интенсивность гамма-излучения. Последняя величина пропорциональна интенсивности сверхслабого излучения. Такая закономерность хорошо проявляется при малых и средних дозах облучения. При больших дозах она нарушается, так как реакция получает развитие, явно непропорциональное дозе, ибо она носит цепной разветвленный характер. При больших дозах наблюдается также резкое возрастание ин-

тенсивности сверхслабого излучения, однако при этом происходит очень ускоренный расход антиоксидантов и исходного неокисленного липида, в результате чего реакция начинает ослабевать и затухает вследствие израсходования материала.

Наибольшая техническая трудность при изучении действия ионизирующих излучений на организмы состоит в том, что различные физико-химические изменения, которые происходят при облучении, приходится регистрировать уже после облучения и часто даже через значительные промежутки времени. Улавливание этих изменений с помощью сверхслабого излучения открыло новые перспективы, так как стало возможным оценивать интенсивность окисления биолипидов и появление в них окислительных радикалов.

Однако и здесь возникли определенные трудности. Непосредственно облучать организмы, отдельные органы и гомогенаты около фотоумножителя нельзя, так как попадание даже незначительного количества ионизирующих излучений на фотокатод выводит из строя этот прибор. Кроме того, под действием ионизирующих излучений в различных материалах — стекле, металле, полимерах — возникали вторичные свечения, которые искажали результаты измерений.

Ц. М. Авакяну (Авакян, Аджан, Атаян, 1963) удалось сконструировать фотоумножительную установку, при помощи которой можно было во время непосредственного облучения проводить изучение сверхслабых свечений биологических объектов. Это было достигнуто применением высококачественных световводов из нелюминесцирующих материалов, а также путем экранирования фотоумножителя. С помощью такой установки удалось показать следующее: 1 — под действием рентгеновского излучения интенсивность сверхслабой хемилюминесценции возрастает; 2 — здесь имеет место индуцирование и переход развития реакции из стационарного режима в нестационарный. Эти исследования были произведены на проростках растений.

Следует учитывать, что в связи с наличием в растительных клетках целлюлозы, непосредственно при облучении возникают два типа свечения: 1 — индуцированное, которое сразу же после облучения начинает спадать и продолжается в течение максимум десятков минут и 2 — хемилюминесценция в липидах, которая после облучения сильно не возрастает, но затем нарастает в течение часов и дней. Экспериментально показано, что при дозах порядка 30 *кр* индуцированная люминесценция полностью спадает за 20—30 *мин* и уже не может маскировать основную хемилюминесценцию. При слабых и средних дозах облучения (порядка 1 *кр*) хемилюминесценция в первые часы после облучения не обнаруживает нарастания интенсивности, однако впоследствии, в течение нескольких дней она нарастает, характеризуя развитие лучевого

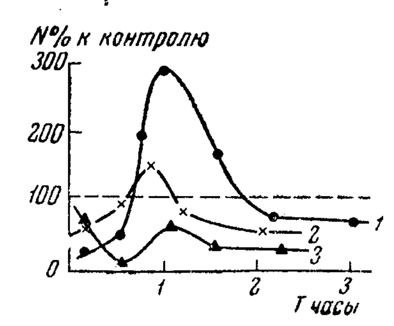


Рис. 18. Изменение хемилюминесценции диплоидных дрожжей, облученных γ-лучами Co^{60} дозами:

1 — 30 крад; *2* — 60 крад; *3* — 90 крад; *N* — относительная интенсивность хемилюминесценции; *T* — время после облучения

поражения. В случае более сильных доз облучения в результате бурного начального развития реакции наблюдается падение интенсивности сверхслабого свечения.

Таким образом, с помощью изучения сверхслабого свечения на живых объектах удалось подтвердить, что ионизирующее излучение индуцирует реакцию окисления в липидах живых клеток.

Методом сверхслабого свечения был выявлен целый ряд явлений, протекающих на поверхности клеток при облучении ионизирующими излучениями, которые были недоступны для других методов исследования. Ю. М. Петрусевич и А. Г. Коноплянников проводили исследования излучений, возникающих на поверхности клеток при внесении их в электрохимическую ячейку, заполненную раствором. В качестве объекта служили клетки дрожжей.

В электрохимическую ячейку вводилась суспензия клеток постоянной концентрации в различные сроки после облучения гамма-лучами; интенсивность излучения, возникающего на поверхности клеток, регистрировалась с помощью фотоумножителя. Было обнаружено, что при действии тока в 10 *ма* в течение 7—10 *мин* повреждений в клетках не происходило; поэтому имеющиеся измерения следует считать прижизненными. Кроме того, было установлено, что сразу же после облучения дозами от 30 до 90 *кр* наблюдается некоторое снижение интенсивности хемилюминесценции, а затем ее повышение до максимума через 40—50 *мин;* после этого происходит снижение излучения до значений, лежащих ниже, нежели у контрольных клеток дрожжей (рис. 18).

Такой эффект высвечивания связан с взаимодействием образующихся при электролизе радикалов с молекулами липидов и антиоксидантов в липидных оболочках клеток. Обнаруженное фазовое изменение способности облученных дрожжевых клеток к хемилюминесценции, вероятно, отражает динамику индуцированного облучением окисления липидов оболочки клетки и расходование антиокислителей.

VII. СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ

Усиление интенсивности излучения под действием температуры и облучения и даже переход в резкую вспышку в тех случаях, когда температура в опытах с проростками растений вызывала их гибель, заставили вспомнить утверждение В. В. Лепешкина (1934), что при гибели клеток возникает излучение — некробиотические лучи.

Новейшие исследования, проводимые современными методами, подтверждают это положение. В. В. Перелыгиным было установлено, что поверхность сокращающегося сердца лягушки при вскрытой брюшной полости дает непрерывное сверхслабое излучение в видимой части спектра. При нанесении на поверхность сердца из пипетки 20% аммиака, щавелевой, лимонной и трихлоруксусной кислот возникает в течение нескольких секунд вспышка, которая продолжается несколько минут и превышает начальное излучение в три-четыре раза. Подобная же вспышка возникает и при действии вышеуказанных веществ и на поверхность тела дождевых червей, прозрачных личинок насекомых (каретра), икринок лягушки и клеточных культур (рис. 19).

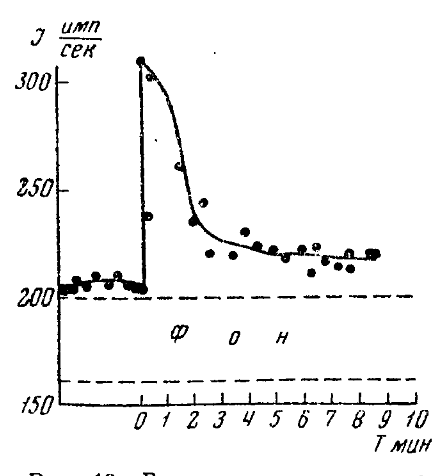


Рис. 19. Вспышка хемилюминесценции при действии трихлоруксусной кислотой на дождевых червей: *I* — интенсивность хемилюминесценции; *T* — время

Этот эффект, как было установлено, получается только на живых клетках. В. В. Лепешкин (из-за несовершенства своего метода регистрации свечения) был неправ только в оценке спектрального характера такого излучения, и, конечно, он не мог получить информацию о том, что живые клетки излучают также в нормальном состоянии. Он был близок к истине и в оценке физико-химической природы излучения, считая, что оно связано с распадом липопротеиновых комплексов — по его терминологии — витаидов.

Сейчас действительно есть полное основание предполагать, что именно при распаде этих комплексов липид, отщепившийся от белка, теряет свои антиоксидативные системы и, энергично окисляясь, дает интенсивную хемилюминесценцию.

VIII. СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ РОСТЕ

При сравнительном исследовании интенсивности свечения различных здоровых органов животных было установлено, что все клетки испускают сверхслабое излучение, но оно сравнительно мало отличается по своей величине. Интенсивность же излучения клеток раковых опухолей, изученных на крысах и мышах, явно слабее контрольного в два-три раза.

Возникло предположение, что в раковых клетках существуют более мощные антиокислительные системы, а это вполне соответствовало представлениям, существовавшим в литературе о том, что в раковых клетках окислительные процессы подавлены. Для проверки этого положения мы провели исследование по оценке суммарной антиокислительной активности липидов.

В первых же исследованиях, проведенных на экспериментальных саркомах крыс — саркома Иенсена и саркома 45, было показано, что в опухолях наблюдается повышенная концентрация антиокислителей. Особенно высокого значения она достигала в молодых опухолях и несколько снижалась по мере их старения. Исходя из этих данных, стало возможным объяснить понижение способности к свечению тем, что благодаря высокому содержанию антиоксидантов или их высокой активности, стационарный уровень окисления липидов находится на более низком уровне.

Сразу же обратил на себя внимание тот факт, что при изучении антиоксидативной активности экспериментальных опухолей существует некоторое несовпадение результатов оценки антиоксидативных свойств при химическом определении и при определении методом сверхслабого свечения.

При определении количества антиоксидантов в тканях опухолей по способности эфирных и спиртовых экстрактов тормозить образование перекисей в окисляющейся олеиновой кислоте при температуре 50° С были получены следующие результаты (табл. 12).

Данные табл. 12 показывают, что хотя злокачественные опухоли и содержат значительное количество антиоксидантов, в целом оно не больше, чем в печени или мозге.

Параллельно с этими определениями проводилась оценка количества антиоксидантов по вспышке хемилюминесценции, которая наблюдалась при прибавлении тех же экстрактов к окисленной олеиновой кислоте.

Некоторый разнобой цифр в табл. 13 объясняется тем, что в опухоли очень трудно отобрать и исключить некротизированные участки.

При сопоставлении табл. 12 и табл. 13 видно, что анти-

окислительная активность, определяемая этими методами, сильно различается.

Таблица 12

Антиокислительная способность вытяжек из тканей, опухолей и органов животных

Объект исследования	Антиокислительная способность, %	
	эфирные вытяжки	спиртовые вытяжки
Головной мозг	76	—
Саркома 45 (на 25 сутки)	72	94
Саркома Иенсена (на 14 сутки)	82	—
Печень	73	95
Селезенка	60	—
Мышечная ткань	57	85
Соединительная ткань	32	81

Если все полученные в табл. 12 и 13 значения отнести к величинам, характеризующим саркому Иенсена, можно получить относительную ингибирующую активность (табл. 14).

Таблица 13

Влияние вытяжек из органов, опухолей и тканей животных на хемилюминесценцию ряда веществ

Объект исследования	Взаимодействие с олеиновой кислотой	Взаимодействие с оливковым маслом	Взаимодействие с перекисью водорода
Фон	30—40	33—40	40—60
Олеиновая кислота	82—100	—	—
Оливковое масло	—	160—184	—
Перекись водорода	—	—	70—100
Соединительная ткань	130—152	219—254	450—500
Мышцы	206—240	—	—
Печень	349—392	356—386	100—700
Селезенка	—	588—628	—
Головной мозг	579—620	—	—
Саркома 45 (на 20—25 сутки)	2090—2253	578—618	1200—1300
Саркома Иенсена (на 20 сутки)	1730—2200	—	—

Эти данные показывают, что при равном химическом эффекте ингибирования антиоксиданты опухолевых клеток обладают повышенной ингибирующей активностью.

Таблица 14

Относительная ингибирующая активность органов, опухолей и тканей ракового животного

Объект исследования	Химическое определение	Хемилюминесценция
Головной мозг	1	0,3—0,5
Печень	0,6—0,8	0,35
Селезенка	0,6—0,7	0,4
Мышечная ткань	0,6—0,8	0,2
Соединительная ткань	0,3—0,4	0,15
Саркома Иенсена	1	1
Саркома 45	—	2

Не входя в разбор возможных химических свойств, которые связаны с высокими выходами хемилюминесценции, следует сразу же отметить, что антиоксиданты липидов раковых клеток обладают какими-то качественными особенностями и не идентичны антиоксидантам нормальных клеток. Эти опыты естественно побудили интерес к способности торможения сверхслабого излучения в клетках злокачественных опухолей и вызвали необходимость разработки прямого хемилюминесцентного метода, оценивающего активность антиоксидантных систем в раковых клетках. Нами была построена модель, в которой при окислении возникала сверхслабая люминесценция. Эта модель по интенсивности (концентрации свободных радикалов) и спектральному составу свечения подобна излучаемой живыми системами. Такая модель позволила непосредственно оценивать способность тканевых экстрактов снижать интенсивность свечения. В качестве такой системы мы использовали электрохимическое окисление аминокислот. При пропускании слабого тока через раствор аминокислот на платиновом электроде — аноде возникает окислительная реакция. При незначительном токе расход вещества очень низок, система может в течение длительного времени сохра-

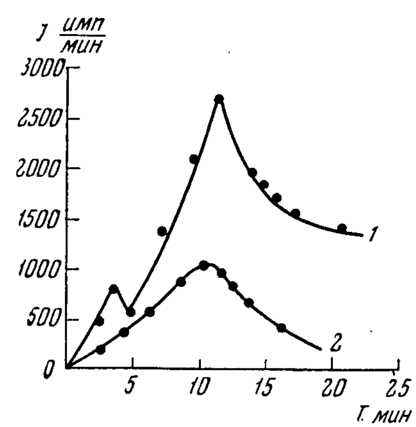


Рис. 20. Изменение интенсивности хемилюминесценции клеточных взвесей при электролитическом окислении:

1 — нормальные клетки из почки обезьяны; *2* — клетки ракового типа (Hela); *I* — интенсивность хемилюминесценции; *T* — время

нять постоянный режим. Подобная электрохимическая ячейка дает слабое свечение, которое служит показателем образования и рекомбинации свободных радикалов. Прибавление антиоксидантов к этой системе вызывает подавление окисления и ослабление свечения.

Эту же электрохимическую ячейку можно использовать и в другой модификации. Наполнить ее солевым раствором, который не окисляется и не дает при пропускании тока свечения на электроде, и в раствор добавить живые переживающие клетки. Под действием электрического тока — клетки начинают светиться. Интенсивность окисления, а следовательно, и испускаемого свечения будет зависеть от содержания антиоксидантов в клетках.

Клетки в количестве 10^6 в 0,85 *мл* физиологического раствора помещались в электролитическую ячейку с платиновыми электродами. Клетки различных органов готовились методом трипсинизации тканей, а также брались из клеточных культур обезьяних почек, легких, органов человеческого эмбриона и т. д. Среди них клетки здоровые и раковые. Чем больше в клеточных структурах антиоксидантов, тем слабее свечение при равных условиях электрического режима (Пятенко, Тарусов, 1964) (рис. 20).

Таблица 15

Электрохемилюминесценция органов, опухолей и тканей животных

Объект исследования	Тип клеток	Интенсивность свечения, *имп/мин*
Почки обезьяны (культура)	нормальные	2200±50
Легкое человеческого эмбриона . .	»	1920±50
9-дневный куриный эмбрион . . .	»	1750±80
Сердце обезьяны	»	1300±110
Клетки из раковой опухоли желудка	раковые	950±50
Клетки из раковой опухоли молочной железы	»	870±40
Клетки из раковой опухоли гортани Нер-2	»	1100±60
Клетки из раковой опухоли молочной железы Са Ма	»	980±70

Раковые клетки, полученные трипсинизацией раковых опухолей, а также культуральные клетки ракового происхождения Нер-2, Са Ма испускают явно более слабое свечение, нежели здоровые нормальные клетки. Это происходит вследствии того, что в раковых клетках имеется более мощная антиокислительная система, сосредоточенная, как показали дальнейшие исследования, в липидных структурах. Правильность нашего предположения подкрепляется химическими исследованиями антиокислительной активности раковых тканей,

проведенных Е. А. Нейфахом (1963). При сравнительном исследовании он показал, что в большинстве раковых опухолей биоантиоксидантов значительно больше, нежели в клетках различных нормальных органов. Этим автором было также отмечено, что в тканях животных опухоленосителей в различных органах — печень, почки, семенники, мозг — наблюдается снижение количества биоантиоксидантов, прогрессирующее с ростом опухоли. Напротив, непосредственно в клетках опухоли количество биоантиоксидантов неуклонно увеличивается. Антиокислительная активность в этом исследовании определялась кинетическим методом, по торможению скорости окисления олеиновой кислоты. В этом же направлении проводились работы и методом сверхслабой люминесценции.

Электрохимическая модель сверхслабого свечения в последнее время значительно улучшена, и с ее помощью получена относительно высокая стабильность излучения. Общее повышение чувствительности метода позволяло измерять количества антиокислителей, соответствующие 10^{-8}—10^{-10} *моля/л*, что значительно превышает чувствительность химических методов. С помощью этой модели было предпринято исследование количества антиоксидантов в липидах органов и тканей животных при развитии злокачественного роста (Петрусевич, Иванов, Тарусов, 1965).

Одновременно проводились исследования антиокислительной активности вытяжки из этих тканей по люминесцентной вспышке на окисляющейся олеиновой кислоте. Сериям крыс для этой цели трансплантировались опухоли — саркома 45, карцинома Уокера и асцитная опухоль ОЯ. По мере развития опухолей, крысы забивались по несколько штук из каждой серии; навески нормальных тканей и опухолей подвергались лиофильной сушке, после чего из них спиртом экстрагировались липиды. Полученные экстракты затем исследовались на антиокислительную активность методами сверхслабого свечения. Итоговые результаты показали, что данные, полученные двумя вышеописанными методами, дают закономерность одного типа.

Из данных табл. 16 видно, что общее количество антиоксидантов, накапливающихся в раковой опухоли по мере ее развития, возрастает, исключая последние стадии, где происходит некоторое уменьшение количества биоантиоксидантов, что, по-видимому, объясняется бурным развитием некрозов в опухолевой ткани.

Сопоставление концентраций биоантиоксидантов на единицу веса в опухоли и печени крыс с привитой опухолью приведено на рис. 21.

Приведенные кривые показывают, что в процессе развития опухоли возникает градиент концентрации биоантиоксидантов между опухолью и печенью больного животного. Ве-

Таблица 16

Изменение общего количества антиоксидантов в опухоли в процессе ее развития

Вес опухоли, г	Дни после перевивки опухоли	Σ_1 — относительное содержание антиоксидантов, определяемое на модели олеиновой кислоты	Σ_2 — относительное содержание антиоксидантов, определяемое на модели электрохемилюминесценции
0,5	9	2,8	3
5,4	16	52	12
7	17	—	19
15,6	19	72	42
26,5	22	183	89
31,8	26	143	—

личина этого градиента достигает максимума на 9 день в случае карциномы Уокера и на 14 день для саркомы 45, что соответствует в наших опытах разным скоростям развития этих опухолевых штаммов. Опыты показали, что в результате роста новообразования печень теряет, а опухоль приобретает антиоксиданты.

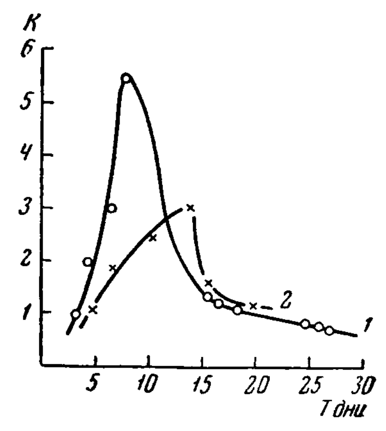


Рис. 21. Изменение относительной концентрации биоантиоксидантов в опухоли и печени крысы — опухоленосителя:

1 — карцинома Уокера; *2* — саркома 45; *К* — относительная концентрация; *Т* — время с момента перевивки опухоли

В молодой опухоли в первые дни ее развития имеется (при учете на единицу веса) явный перевес в содержании антиоксидантов по сравнению с гомологичными нормальными тканями. В дальнейшем рост антиоксидантов уменьшается, вероятно, вследствие того, что часть клеток погибает. Однако если учесть общую массу опухоли, то приток антиоксидантов в нее продолжает возрастать, хотя и непропорционально росту опухоли. Изучение других органов показало, что такой же поток антиоксидантов должен идти и из них, только его удельный вес, по сравнению с печенью, меньше.

Переброска антиоксидантов из органов в растущую злокачественную опухоль может происходить, по-видимому, через кровяное русло. Поэтому очень интересно было непосредственно обнаружить этот поток в крови с тем, чтобы оценить его параметры. Конечно, в крови концентрация переносимых антиоксидантов мала и химически обнаружить эти количества в крови было задачей явно безнадежной. Приближенные подсчеты, однако, позволяли надеяться, что методами сверхслабого излучения это, по-видимому, можно сделать. Поэтому было предпринято изучение антиоксидативной активности крови, определяемой в плазме и сыворотке, которая в количестве 0,2—0,8 *мл* добавлялась в электрохимическую ячейку со стабильным очень слабым излучением в сине-зеленой части спектра.

Было установлено, что плазма и сыворотка крови у нормальных животных всегда обладают некоторым антиоксидативным действием и снижают интенсивность окислительной хемилюминесценции, т. е. в крови всегда имеется поток антиоксидантов, который, как показали исследования, отличается высокой стабильностью. Этот поток, по-видимому, восполняет тот дефицит в антиоксидантах, который возникает при их непрерывном расходовании в различных тканях. Он служит основным источником, компенсирующим расход и удерживающим реакции окисления структурных липидов на стационарном уровне.

При развитии экспериментального рака вскоре после прививки можно заметить, что тушащий (ингибирующий) эффект плазмы крови начинает увеличиваться и нарастает во времени (рис. 22). Количество тушащих веществ у крыс с опухолями явно превышает их количество у здоровых. Через 15—20 дней после прививки тушащий эффект в крови больных животных возрастает в 2—2,5 раза. Прирост антиоксидантов в крови характеризует скорость роста опухоли.

Для более полного подтверждения выдвинутых положений И. И. Ивановым, Ю. М. Петрусевичем были проделаны опыты по изучению количества веществ тушащих сверхслабое свечение в печеночной вене и венах, выходящих из зоны опухолевого роста. Они установили, что на фоне общего возрастания тушащего фактора в плазме количество этих веществ в крови, омывающей печень, было больше, нежели в крови, омывающей опухоль. Уменьшение концентрации антиоксидантов в плазме крови, омывающей опухоль, служит прямым указанием на депонирование опухолевой тканью естественных антиоксидантов, поступающих в опухоль из тканей животного, главным образом из печени с током крови (рис. 23).

Исследование способности плазмы крови подавлять интенсивность сверхслабой хемилюминесценции показывает, что этим способом могут быть выявлены чрезвычайно малые ко-

лебания в количестве антиоксидантов. На основании определения суммарного количества антиоксидантов можно также получить ценную информацию о скорости роста опухоли, потребляющей эти антиоксиданты.

Исследование проб крови животных в процессе развития злокачественных опухолей показало, что в случае карциномы Уокера, саркомы — 45 и асцитной опухоли ОЯ наблюдается определенное увеличение количества антиоксидантов в крови животных с ростом опухоли.

Для того чтобы установить, не являются ли вещества, тушащие хемилюминесценцию, продуктами, поступающими в кровь при любом распаде тканей, исследовались тушащие свойства плазмы в крови крыс при развитии широких воспалительных процессов. Эти опыты с вызыванием обширного очага воспаления введением скипидара показали, что наличие сильного воспалительного процесса не вызывает появления каких-либо веществ со свойствами ингибитора хемилюминесценции, которые были характерны для злокачественного роста.

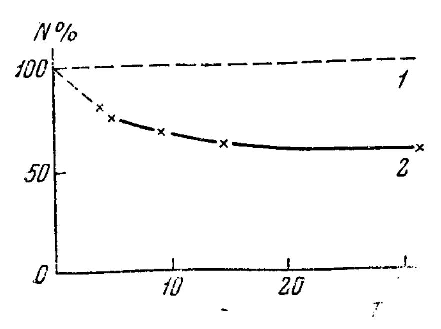


Рис. 22. Изменение ингибирующей активности плазмы крови животного в процессе развития раковой опухоли (карцинома Уокера): *N* — относительное изменение ингибирующей активности; *T* — время с момента перевивки опухоли; *1* — плазма крови контрольного животного; *2* — плазма крови опухолевого животного

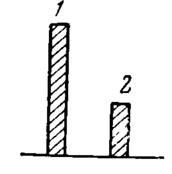


Рис. 23. Относительное содержание естественных антиоксидантов в плазме крови печеночной вены (1) и в венах (2), выходящих из зоны опухолевого роста

Можно было предположить, что эти вещества образуются в опухоли и при ее распаде поступают в кровь. Были поставлены опыты (Петрусевич, Иванов, 1965) с химиотерапевтическим средством — сарколизином, который очень хорошо разрушает некоторые экспериментальные злокачественные новообразования. С этой целью крысам, у которых величина опухоли (карцинома Уокера) достигала приблизительно 20 *мм* в диаметре, внутрибрюшинно вводился сарколизин в дозе 5 *мг* на 1 *кг* веса. Параллельно с проведением химиотерапии у животных из подключичной вены брались пробы крови, ко-

торые затем исследовались вышеописанной методикой. Введение сарколизина вызывало остановку роста опухоли; при этом количество антиоксидантов в плазме крови и в печени опухолевого животного возвращалось к норме.

Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что регистрируемые антиоксиданты не являются продуктами распада (некрозов) тканей злокачественных опухолей, а возникают и существуют только при развитии опухоли.

В связи с тем, что использованный в наших исследованиях физический метод тушения сверхслабой хемилюминесценции обнаруживает антиоксиданты в ничтожно малых концентрациях, едва ли доступных для химического анализа, вопрос о природе этих антиокислителей остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования, проводимые в области сверхслабых свечений, уже сейчас показывают, что это свечение, испускаемое всеми живыми клетками, представляет собой источник ценной информации о физиологическом состоянии клеток, целостности и нарушении их структур.

Уже получены ценные сведения о физико-химическом состоянии структурных липидов в клетках и протекающих в них реакциях. Есть основания полагать, что источниками излучения могут быть не только липиды. В последнее время обнаружено, что сверхслабая хемилюминесценция сопровождает, например, процессы денатурации белков и наблюдается при разрушении ферментов.

В настоящее время можно уже определенно сказать, что сверхслабое излучение клеток может быть использовано в качестве чувствительного детектора для оценки повреждающих воздействий и границ адаптации биологических систем к различным внешним воздействиям, т. е. выявлению тех конечных порогов, в пределах которых возможно существование динамического равновесия химических реакций в клетках. Поэтому делаются попытки использовать это излучение для быстрого обнаружения устойчивости клеток и организмов к температурным условиям (морозо- и теплоустойчивость), полноценности минерального питания, для оценки жизнеспособности тканей, предназначенных к трансплантации и т. д. Развиваются исследования по изучению при помощи хемилюминесценции механизмов окислительных реакций, которые индуцируются ионизирующими излучениями в клеточных субстратах. Представляется весьма перспективным оценивать и регистрировать по этому излучению и тушащему эффекту состояние антиокислительных систем — ингибиторов окисления, которые играют большую роль в клетках. Заслуживает внимания возможность по эффекту тушения модельных люминесцирующих систем определять транспорт антиоксидативных веществ в крови в очень малых количествах.

Дальнейшие успехи в этой области, конечно, связаны с усовершенствованием методов регистрации сверхслабых потоков лучистой энергии и методов их спектральной оценки.

ЛИТЕРАТУРА

Авакян Ц. М., Аджян Н. С., Атаян Р. Р. Магнитная дефокусирующая установка для обнаружения спонтанного сверхслабого свечения биосубстратов. «Биофизика», 1963, т. 8, вып. 3.

Авакян Ц. М., Тарусов Б. Н., Аджян Н. С. Кислородный эффект биолюминесценции. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Агавердиев А. Ш., Доскоч Я. Е., Тарусов Б. Н. Влияние низких температур на сверхслабое свечение растений. «Биофизика», 1965, т. 10, вып. 5.

Агавердиев А. Ш., Доскоч Я. Е., Тарусов Б. Н. Сверхслабое излучение растений при понижении температуры. ДАН СССР, 1965, т. 163, № 4.

Агавердиев А. Ш., Тарусов Б. Н. Сверхслабая хемилюминесценция стеблей пшениц в зависимости от температуры. «Биофизика», 1965, т. 10, вып. 2.

Агавердиев А. Ш., Тарусов Б. Н. Температурная зависимость интенсивности сверхслабой хемилюминесценции стеблей пшеницы и кукурузы. «Уч. зап. Азерб. гос. ун-та», сер. биол., 1965, т. 10, вып, 2.

Беневоленский В. Н., Дружинин Ю. П., Алексеева С. И. Сверхслабая хемилюминесценция при реакции нативного водносолевого экстракта печени крыс спернатантом из гомогената. «Биолюминесценция», «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Бурдин К. С., Пархоменко И. М., Петрусевич Ю. М. Использование метода хемилюминесценции для изучения механизмов радиозащитного действия. «Свободнорадикальные процессы в биологической системе». «Тр. МОИП», т. 16. М., «Наука», 1966.

Бурлакова Е. В., Исмаилова С., Козлов Ю. П. Ингибирование роста злокачественных опухолей растительных клеток радикальной полимеризацией веществ. «Физико-химические основы авторегулирования в клетках». Тез. докладов симпозиума МОИП. М., «Наука», 1965.

Васильев Р. Ф. Химическое свечение. «Природа», 1964, № 12.

Васильев Р. Ф. О некоторых вопросах механизма хемилюминесценции. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965,

Васильев Р. Ф. Фотоэлектрические установки для измерения слабых свечений. «Биолюминесценция», «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Васильев Р. Ф., Вичутинский А. А. О природе связи хемилюминесценции и окисления молекулярным кислородом. ДАН СССР, 1962, т. 142, № 3.

Васильев Р. Ф., Вичутинский А. А. Исследование хемилюминесценции в реакциях жидкофазного окисления. «Изв. АН СССР», сер. физ., 1963, т. 27, № 6.

Васильев Р. Ф., Русина И. Ф. Механизм хемилюминесценции при окислении органических веществ в растворах. ДАН СССР, 1964, т. 156, № 6.

Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф. Исследование сверхслабых свечений в биологических системах. «Биофизика», 1959, т. 4, вып. 5.

Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф. О механизме сверхслабых свечений в биологических системах. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП, т. 21. М., «Наука», 1965.

Владимиров Ю. А., Львова О. Ф. Сверхслабое свечение и окислительное фосфорелирование в митохондриях. «Биофизика», 1964, т. 9, вып. 4.

Веселовский В. А. Сверхслабая биолюминесценция проростков злаковых. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Веселовский В. А., Секамова Е. Н., Тарусов Б. Н. К вопросу о механизме сверхслабой спонтанной люминесценции организмов. «Биофизика», 1963, т. 8, вып. 1.

Гасанов Р. А., Мамедов Т. Г., Тарусов Б. Н. О взаимосвязи сверхслабой хемилюминесценции с жароустойчивостью растительных организмов. ДАН СССР, 1963, т. 150, вып. 4.

Гасанов Р. А., Мамедов Т. Г., Тарусов Б. Н. Спонтанное и индуцированная биохемилюминесценция растений в аэробных и анаэробных условиях. ДАН СССР, 1963, т. 150, вып. 4.

Гасанов Р. А., Мамедов Т. Г., Тарусов Б. Н. Спонтанное и индуцированное сверхслабое свечение растительных организмов. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Гурвич А. Г., Гурвич Л. Д. Митогенетическое излучение. Л., Изд-во ВИЭМ, 1934.

Гурвич А. Г., Залкинд С. Я., Песоченский Б. С. Учение о раковом тушителе. М., Изд-во АМН СССР, 1947.

Журавлев А. И., Веселовский В. А. Живое свечение. М., «Знание», 1963.

Журавлев А. И., Корженко В. П. Хемилюминесценция липидов и скорость роста лососей. ДАН СССР, 1963, т. 152, вып. 2.

Журавлев А. И., Меламид А. Е., Свищев Т. М., Ковалева Т. А., Попов Г. А., Регинский Ф. Н. К измерению хемилюминесценции неохлажденным ФЭУ. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах». Тез. докл. симпозиума МОИП. М., Изд-во АН СССР, 1964.

Журавлев А. И., Поливода А. И., Тарусов Б. Н. Механизм инактивации радикалов и перекисей естественными антиоксидантами. «Радиобиология», 1961, т. 1, вып. 3.

Журавлев А. И., Тарусов Б. Н. О механизме защитного антиокислительного действия серосодержащих соединений. «Радиобиология», 1962, т. 11, вып. 2.

Журавлев А. И., Тарусов Б. Н., Есакова Т. Д. Новая физико-химическая особенность раковых опухолей. «Тр. VIII Международного противоракового конгресса», т. 4. М., Изд-во АН СССР, 1963.

Журавлев А. И., Филипов Ю. Н., Симонов В. В. Хемилюминесценция и антиокислительные свойства тканей липидов человека. «Биофизика», 1964, т. 9, вып. 6.

Иванов И. И., Петрусевич Ю. М. Регистрация спектров хемилюминесценции ненасыщенных жирных кислот и некоторых биолипидов. «Научн. докл. высш. школы», 1965, вып. 3.

Иванов И. И., Петрусевич Ю. М., Тарусов Б. Н. Регулирование уровня эндогенных антиоксидантов в процессе злокачественного роста. «Физико-химические основы авторегуляции в клетках». Тез. докл. симпозиума МОИП. М., «Наука», 1965.

Клипсон Н. А., Мамедов Т. Г., Тарусов Б. Н. Люминесцентный метод исследования свободнорадикальных состояний. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Козлов Ю. П., Тарусов Б. Н. Определение свободнорадикальных состояний методом привитой сополимеризации. «Высокомолекулярные соединения», 1961, т. 3, вып. 8.

Конев С. В. К вопросу о природе и биологическом значении сверхслабых свечений клетки. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Кудряшев Ю. Б. и др. Естественный радиомиметик и его действие на различные биологические объекты и системы, «Журн. общей биологии», 1961, № 1.

Мальц В. Изучение окислительных процессов в липидах организмов при облучении. «Биофизика», 1960, т. 5, вып. 5.

Нейфах Е. А. К механизму окисления жирных кислот в раковых и нормальных тканях. «Тр. VIII Междун. противоракового конгресса». т. 6. М., Изд-во АН СССР, 1963.

Петрусевич Ю. М., Иванов И. И. Сверхслабая хемилюминесценция, индуцированная свободными радикалами в процессе электролитического окисления. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах». «Тр. МОИП», т. 16. М., «Наука», 1966.

Петрусевич Ю. М., Иванов И. И. Исследование спектров хемилюминесценции в процессе окисления аминокислот. «Биофизика», 1965, т. 4, вып. 2.

Петрусевич Ю. М., Иванов И. И., Тарусов Б. Н. Исследование сверхслабых излучений для обнаружения антиоксидантов в крови при злокачественном росте. «Вестн. Моск. ун-та», сер. биол., 1966, № 1.

Петрусевич Ю. М., Коноплянников А. Г. Хемилюминесценция при действии свободных радикалов на нормальные и облученные дрожжевые клетки. «Биофизика», 1965, т. 3, вып. 2.

Попов Г. А., Тарусов Б. Н. О природе спонтанной люминесценции тканей животных. «Биофизика», 1963, т. 8, вып. 3.

Попов Г. А., Тарусов Б. Н. Кинетика хемилюминесценции при разложении перекиси водорода экстрактами печени животных. «Биофизика», 1964, т. 9, вып. 4.

Пятенко В. С., Тарусов Б. Н. Катодное свечение нормальных и раковых клеток. «Биофизика», 1964, т. 9, вып. 1.

Сапежинский И. И., Силаев Ю. Е. Возникновение свечения при действии на сывороточный альбумин кислот. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Семенов Н. Н. О некоторых проблемах химической кинетики и реакционной способности. М., Изд-во АН СССР, 1958.

Тарусов Б. Н., Журавлев А. И. Биолюминесценция липидов. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Тарусов Б. Н., Иванов И. И., Петрусевич Ю. М. Исследование антиокислительной активности биолипидов при злокачественном росте. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах». «Тр. МОИП», т. 16. М., «Наука», 1966.

Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И. Изучение сверхслабой спонтанной люминесценции животных клеток. «Биофизика», 1961, т. 6, вып. 4.

Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И. Обнаружение хемилюминесценции в печени облученных животных. «Радиобиология», 1961, т. 1, вып. 1.

Тарусов Б. Н., Поливода А. И. Журавлев А. И., Секамова Е. И. Сверхслабое спонтанное свечение тканей животных. «Цитология», 1962, т. 4.

Тхор Л. Ф. О хемилюминесценции олеиновой кислоты. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., «Наука», 1965.

Тхор Л. Ф., Козлов Ю. П. Влияние некоторых антибиотиков на хемилюминесценцию олеиновой кислоты. «Биофизика», 1965, т. 10, вып. 3.

Чечик Н. О., Файнштейн С. М., Лифшиц Т. М. Электронные умножители. М., ГИТТИЛ, 1957.

Шляпентох В. Я., Карпухин О. Н., Захаров И. В. Хемилюминесцентные методы изучения радикальных реакций. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах». «Тез. докл. симпозиума МОИП», М., Изд-во АН СССР, 1964.

Эммануэль Н. М., Круглякова К. Е., Жижина Г. П., Вичутинский Р. Ф., Васильев Р. Ф. Хемилюминесценция растворов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) после облучения рентгеновыми лучами. «Биолюминесценция». «Тр. МОИП», т. 21. М., Изд-во «Наука», 1965.

Эммануэль Н. М., Лясковская Ю. Н. Торможение процессов окисления жиров. М., Пищепромиздат, 1961.

Colli L., Facchini U., Guidotti G., Dugnani R., Lonati R., Orsenigo M., Somnariva O. Luminescence of biological living plant roots. Experientia, 1955, vol. 11, No. 6,

Colli L., Facchini U., Rossi A. Study of RCA 5819 and EMI 62—60 Photoamplifier as individual photon counters, «Nuovo cimento», 1954, vol. 11.

Hofert M. Versuche über strahleninducirte Chemilumineszenz München, 1964.

Iwanow S. Veränderung des chemischen bestand des pflanzen in verschiedenen klimatischen zonen. «Berliner Botani ges», 1926, vol. 31.

Lepeschkin W. Über nekrobiotische strahlungen Protoplasma, 1933, Bd 21.

Strehler B. L. The luminescence of isolated chloroplasts. «Arch. Biochem. and Biophys.», 1951, No. 34.

Tarusow B. N., Polivoda A. I., Juravlev A. I. Detection of very low intensity radiation from animal tissues, their mechanism and kineticsn Abstracts of Contributed papers Internat, Biophis Congr. Stocholm, 1961.

Tarusow B. N. Radical determination by luminescence. Vortrag Internat. Congr. of Rad. Res. Harrogate, 1962.

Wassilev R. F. Secondary Processes in Chemilumi-nescent solutions. «Nature», 1962, vol. 196, No. 4855,

СОДЕРЖАНИЕ

Борис Николаевич Тарусов,
Илья Ильич Иванов,
Юрий Михайлович Петрусевич

СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Тематический план 1966 г. № 39
Редактор *Н. М. Глазкова*
Технический редактор *К. С. Чистякова*
Корректоры *С. В. Игошина, Л. С. Клочкова*

Сдано в набор 4/VII 1966 г.
Подписано к печати 20/II 1967 г.
Л-41651 Формат 60×90[1]/16
Физ. печ. л. 4,5 Уч.-изд. л. 4,44 Изд. № 28
Зак. 728 Бум. тип. № 1 Тираж 2600 экз.
Цена 28 коп.

Издательство Московского университета
Москва, Ленинские горы
Административный корпус

Типография Изд-ва МГУ (филиал).
Москва, проспект Маркса, 20

Цена 28 коп.